

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

EFFET DE L'INFECTION PAR LE VIRUS DE LA STOMATITE VÉSICULEUSE
SUR L'EXPRESSION DU GÈNE DU FACTEUR NUCLÉAIRE κ B ET SUR
L'EXPRESSION DE SA SOUS UNITÉ INHIBITRICE κ B ALPHA.

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR
ROSE-MARIE BRITO

SEPTEMBRE 2010

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

J'aimerais avant tout remercier le docteur Laurent Poliquin qui m'a permis de faire une maîtrise dans son laboratoire à l'UQAM. Il est une personne très patiente et compréhensive. Malgré le fait que je ne lui demandais pas souvent de l'aide, je savais que je pouvais compter sur lui en tout temps. Il est un homme de cœur qui aime profiter de la vie et j'aimais bien qu'il nous accompagne dans nos soirées. Merci Laurent!

J'aimerais aussi remercier mes collègues étudiants. Étienne Dorval qui a quitté, mais avec qui je conserve une grande amitié. Il y a aussi Ian Boisseau et Jean-Michel Bergeron G. qui m'ont aidée au laboratoire et avec qui nous avons eu des conversations enflammées et pertinentes. Je ne dois pas oublier non plus Christian Moro qui m'a accompagnée très souvent dans mes activités hors laboratoire et Frederic Brassard qui est arrivé en dernier, mais qui m'a fait rire aussi.

Les étudiants du laboratoire du docteur Éric Rassart ont aussi été importants lors de ma maîtrise et j'aimerais les remercier de tout cœur d'avoir été présents à ce moment de ma vie. Les gens qui entrent dans nos vies laissent tous une marque et je me souviendrai toujours d'eux.

Je dois remercier ma fille, Jaymee, qui a été compréhensive envers moi et les horaires tordus qu'on a lors de nos études. Souvent, je l'emmenais au laboratoire et elle était contente de m'accompagner et même de m'aider quand elle le pouvait. J'aimerais te remercier Jaymee d'être la motivation qui me permet de me réaliser comme personne et comme mère de famille. Je t'aime plus que tout au monde!

Mes parents et le reste de ma famille, ainsi que mes amis ont été d'un grand soutien moral, car ils m'ont toujours encouragée à poursuivre mes études, malgré tous les obstacles que la vie peut dresser. En particulier, j'aimerais remercier Isa, qui depuis 10 ans, m'aime sans condition et croit en moi.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	ix
RÉSUMÉ.....	xi
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I	
CONTEXTE THÉORIQUE	
1.1. Les interférons.....	3
1.2. Induction de l'interféron- β	5
1.3. Le facteur de transcription nucléaire kappa-B : NF- κ B.....	9
1.4. I κ B : inhibiteur spécifique du NF- κ B.....	11
1.5. Les I κ B kinases.....	12
1.6. Le virus de la stomatite vésiculeuse : VSV.....	14
1.6.1 Réplication de VSV.....	17
1.6.2 La protéine de la matrice (M) de VSV.....	20
1.6.3 Mutants de VSV.....	21
1.7. Projet d'étude.....	22
CHAPITRE II	
MATÉRIELS ET MÉTHODES	
2.1. Culture cellulaire.....	25
2.2. Souches virales.....	25
2.2.1. Infections.....	26

2.2.2.	Récoltes des cellules infectées.....	26
2.3.	Extraction d'ARN total.....	27
2.3.1.	Quantification, vérification de la pureté de l'ARN total et conservation.....	28
2.4.	Amplification en chaîne par polymérase en temps réel (Real time PCR).....	28
2.4.1.	Contexte théorique.....	28
2.4.2.	Réaction de transcriptase inverse et de PCR en une étape avec le système Light Cyclor de Roche.....	30
2.5.	Extraction protéique.....	32
2.5.1.	Dosage protéique	32
2.5.2.	Précipitation protéique à l'acétone.....	32
2.5.3.	Analyse par immunobuvardage.....	33

CHAPITRE III RÉSULTATS

3.1.	Ratio de la concentration d'ARN totale sur la concentration protéique totale.....	35
3.2.	Quantification relative du gène du NF- κ B chez les cellules L929..	37
3.3.	Analyse de la protéine inhibitrice kappa B (I κ B) sous ses formes non phosphorylée et phosphorylée.....	39

CHAPITRE IV DISCUSSION.....	57
--------------------------------	----

CHAPITRE V CONCLUSION.....	66
-------------------------------	----

APPENDICE A.....	68
RÉFÉRENCES.....	75

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1	Modèle du complexe enhanceosome activant le gène de l'IFN- β 7
1.2	Organisation des domaines PRD, NRD et de l'élément NRE dans la séquence du promoteur de l'IFN- β 8
1.3	Structure du complexe formé par NF κ B et la région κ B du gène de l'IFN- β 10
1.4	Représentation schématique de la particule virale de VSV ainsi que de l'ordre dans le génome, des protéines exprimées représentées par les différents symboles. 15
1.5	Représentation schématique du cycle de réplication de VSV..... 19
2.1	Représentation du principe des sondes fluorescentes de Qiagen..... 29
3.1	Ratio de la concentration d'ARN (μ g/ml) sur la concentration de protéines (μ g/ml) à différentes heures (hres) post-infection des cellules HeLa par les virus HR, TP6 et 1026..... 42
3.2	Ratio de la concentration d'ARN (μ g/ml) sur la concentration de protéines (μ g/ml) à différentes heures (hres) post-infection des cellules L929 par les virus HR, TP6 et T1026. 43
3.3	Expression du gène du NF- κ B analysée par PCR en temps réel dans les cellules L929 infectées par les virus HR et TP6..... 44
3.4	Expression de la protéine I κ B α à différentes heures (hres) post-infection (p.i.) dans les cellules HeLa infectées à une multiplicité de 10 pfu/cellule par le virus HR..... 45

3.5	Expression de la protéine I κ B α à différentes heures (hres) post-infection (p.i.) dans les cellules HeLa infectées à une multiplicité de 10 pfu/cellule par le virus T1026.....	46
3.6.	Expression de la protéine I κ B α à différentes heures (hres) post-infection (p.i.) dans les cellules HeLa infectées à une multiplicité de 10 pfu/cellule par le virus TP6..	47
3.7.	Expression de la protéine I κ B α à différentes heures (hres) post-infection (p.i.) dans les cellules L929 infectées à une multiplicité de 10 pfu/cellule par le virus HR.....	48
3.8.	Expression de la protéine I κ B α à différentes heures (hres) post-infection (p.i.) dans les cellules L929 infectées à une multiplicité de 10 pfu/cellule par le virus T1026.....	49
3.9.	Expression de la protéine I κ B α à différentes heures (hres) post-infection (p.i.) dans les cellules L929 infectées à une multiplicité de 10 pfu/cellule par le virus TP6.....	50
3.10.	Expression de la protéine p-I κ B α à différentes heures (hres) post-infection (p.i.) dans les cellules HeLa infectées à une multiplicité de 10 pfu/cellule par le virus HR.....	51
3.11.	Expression de la protéine p-I κ B α à différentes heures (hres) post-infection (p.i.) dans les cellules HeLa infectées à une multiplicité de 10 pfu/cellule par le virus T1026.....	52
3.12.	Expression de la protéine p-I κ B α à différentes heures (hres) post-infection (p.i.) dans les cellules HeLa infectées à une multiplicité de 10 pfu/cellule par le virus TP6.....	53
3.13	Expression de la protéine p-I κ B α à différentes heures (hres) post-infection (p.i.) dans les cellules L929 infectées à une multiplicité de 10 pfu/cellule par le virus HR.....	54

3.14	Expression de la protéine p-I κ B α à différentes heures (hres) post-infection (p.i.) dans les cellules L929 infectées à une multiplicité de 10 pfu/cellule par le virus T1026.....	55
3.15	Expression de la protéine p-I κ B α à différentes heures (hres) post-infection (p.i.) dans les cellules L929 infectées à une multiplicité de 10 pfu/cellule par le virus TP6.....	56

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
2.1 Conditions de PCR en temps réel en une étape du kit <i>QuantiTect Gene expression assays</i> de Qiagen utilisées avec le <i>LightCycler</i> de Roche.....	31
3.1 Tableau récapitulatif de la présence de la protéine I κ B α dans les extraits protéiques de cellules HeLa et L929 infectées par les virus VSV HR, T1026 ou TP6.....	41

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	acide désoxyribonucléique
AKT/PKB	Protéine kinase B
ARN	acide ribonucléique
ATF	Facteur d'activation de la transcription
eIF2 α	Sous unité alpha du facteur d'initiation 2 de la traduction
HBH	Motif hélice-boucle-hélice
HMG1 (Y)	Protéine de haute mobilité 1 (Y)
HPRT1	Hypoxanthine guanine phosphoribosyle tansférase 1
HR	<i>Heat-resistant</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IFN	Interféron
IRF	Facteur régulateur de l'interféron
I κ B	Inhibiteur kappa B
IKK	I κ B kinase
IRAK	<i>Interleukine 1R-associated kinase</i>
MAP	Protéines activées par des agents mitogènes
MAPKKK	MAP kinase kinase kinase
MGB	<i>Minor groove binder</i>
NF- κ B	Facteur nucléaire kappa B
NIK	Kinase induisant NF- κ B
NLS	Séquence de localisation nucléaire
NRD	Domaine régulateur négatif
NRE	Élément régulateur négatif
NRF	Facteur réprimant NF- κ B
O/N	<i>Overnight</i>

PBS	Solution tamponnée au phosphate
PCR	Amplification en chaîne par la polymérase
PFU	Unités donnant naissance à une plaque
PIF	Production d'interféron
PKR	Protéine kinase dépendante de l'ARN double brin
PRD	Domaine régulateur positif
RHD	Domaine d'homologie <i>Rel</i>
SDS/PAGE	Gel d'électrophorèse en polyacrylamide au sodium dodecyl sulfate
TNF- α	Facteur de nécrose tumorale alpha
TRAF-6	<i>TNF receptor-associated factor-6</i>
TS	Thermosensible
SNC	Système nerveux central
SRAS	Syndrome respiratoire aigu sévère
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VSV	Virus de la stomatite vésiculeuse

RÉSUMÉ

La réponse immunitaire primaire fait appel à l'interféron bêta (IFN- β), une cytokine produite lors d'infections virales. L'expression de l'IFN- β est positivement régulée par le facteur nucléaire kappa B (NF- κ B) et celui-ci est retenu au cytoplasme par l'inhibiteur kappa B alpha (I κ B α). L'expression d'IFN- β s'effectue lorsque I κ B α est dégradé suite à sa phosphorylation. Fait intéressant, l'IFN- β n'est pas induit par le virus de la stomatite vésiculeuse (VSV) sauvage, contrairement à son mutant pour la protéine matricielle M (M51R), T1026. De plus, TP6 est un mutant de VSV qui possède la séquence sauvage de M et qui induit fortement l'IFN- β . Ces informations pourraient suggérer qu'à l'opposé de sa forme mutante, VSV sauvage ne permet pas l'expression du gène du NF- κ B et il ne désactive pas I κ B α , par sa phosphorylation ou dégradation, ce qui empêcherait l'activation du gène de l'IFN- β . Cette hypothèse a été vérifiée en mesurant l'expression de l'ARN_m du NF- κ B par PCR en temps réel et la phosphorylation de I κ B α par immunobuvardage (IB) lors d'infections de cellules HeLa (humaines) et L929 (murines). Les données de PCR montrent que l'infection des cellules L929 par le virus HR produit une diminution de l'expression de l'ARN_m du NF- κ B au début de l'infection tandis que le virus TP6 montre une augmentation du NF- κ B. Les IB témoignent que la quantité de I κ B α et de p-I κ B α diminue dans les deux types cellulaires infectés par HR. T1026 amène une expression différente pour les deux formes de I κ B α et pour les deux types cellulaires. Ces résultats montrent que l'infection par ces trois souches de VSV affecte différemment l'expression du NF- κ B et la dégradation de I κ B α , sans toutefois expliquer les différences d'induction de l'IFN- β . La régulation de l'IFN- β au cours de l'infection par VSV pourrait impliquer d'autres mécanismes que la régulation de NF- κ B. La progression des études portant sur VSV est importante car il est oncolytique et il fait partie des moyens envisagés dans le futur pour combattre les cancers.

Mots clés : VSV, IFN- β , NF- κ B, I κ B α

INTRODUCTION

Les virus sont un groupe de parasites fascinants dépendant des mécanismes cellulaires pour se répliquer et évoluer. Lors d'une infection virale, la cellule produit une réponse antivirale dont le but est d'inhiber la réplication du virus. Les virus se sont donc adaptés aux mécanismes de défense des cellules au cours du temps et certains sont devenus des agents infectieux dangereux voire même mortels pour l'être humain et les autres mammifères. Il existe 6000 virus classifiés en 1950 espèces, 82 groupes d'étude, représentant des familles virales ou des genres non assignés, et 391 taxons supérieurs différents (Fauquet et Fargette, 2005). Les virus causent plusieurs effets, qu'on appelle cytopathiques, à la cellule infectée qui finit par se transformer ou mourir. Ils peuvent être la cause de différents cancers et maladies dégénératives. Il existe donc plusieurs raisons à la recherche en virologie, qui est l'étude sur les virus.

Mais les virus ne peuvent pas seulement être considérés comme des agents infectieux nocifs. Ils ont également été utiles à la compréhension des mécanismes de la biologie moléculaire telle la régulation des gènes eucaryotes. En effet, plusieurs éléments de la machinerie de la transcription et de la traduction ont été élucidés à l'aide des virus. Le clivage des protéines lors des mécanismes post-traductionnels, la phosphorylation d'un grand nombre de protéines par des kinases et l'addition d'acides gras aux protéines associées à la membrane sont tous des mécanismes ayant été étudiés avec des virus. Le génie génétique est fondé en partie sur les découvertes en virologie car il a fallu concevoir, entre autres, des vaccins pour combattre les virus. Maintenant, ils peuvent aussi être utilisés à des fins thérapeutiques, surtout dans le cas des virus réplicatifs oncolytiques qui pourraient être utiles au combat contre les

tumeurs malignes. En effet, il est possible grâce au génie génétique de rendre un virus spécifique à une tumeur comme le serait une molécule chimique. Les virus oncolytiques possèdent le potentiel de tuer les cellules comme le fait la chimiothérapie. Ils peuvent éveiller le système immunitaire de l'hôte contre l'antigène tumoral et ils possèdent la capacité de stimuler la production de cytokines qui ont une activité anti-cancer potentielle (Bell *et al.*, 2003). Le virus de la stomatite vésiculeuse (VSV) est un de ces virus. Plusieurs cellules tumorales ne produisent pas d'IFN β ou n'y répondent pas et elles sont donc des cibles de choix pour le VSV qui est sensible à l'action de ces cytokines (Stojdl *et al.* 2003). Toutefois, les cellules avoisinantes, étant saines, ne permettent presque pas la réplication virale. Il y a cependant toujours le risque qu'une croissance virale incontrôlée survienne. La recherche fondamentale est donc importante afin de comprendre les mécanismes impliqués lors d'une infection virale et la réponse immunitaire provoquée chez la cellule hôte.

De ce fait, le sujet de l'étude effectuée lors de ce projet de recherche est basé sur l'effet de l'infection du VSV sur la cellule hôte, plus précisément, sur l'expression de NF- κ B et de la sous unité inhibitrice I κ B, des protéines importantes à la production d'IFN β , acteur important dans la réponse immunitaire innée de la cellule infectée.

CHAPITRE I

CONTEXTE THÉORIQUE

Le plus grand joueur de la réponse antivirale cellulaire chez les mammifères est la production d'interféron alpha et bêta (IFN- α/β) par la cellule. Lorsque l'IFN (α/β) est produit par la cellule infectée, les cellules avoisinantes sont également stimulées et mettent en marche la réponse antivirale qui agit aux différents niveaux du cycle viral ainsi que sur les cellules infectées elles-mêmes, en arrêtant, par exemple, la synthèse protéique. Certains virus comme le VSV sont extrêmement sensibles à l'IFN, tandis que d'autres comme Influenza sont résistants.

1.1 Les interférons

Depuis leur découverte en 1957 par A. Isaacs et J. Lindenmann, les interférons ont été étudiés pour leur capacité à établir un état antiviral chez l'hôte infecté. La plupart des cellules ont la capacité de produire l'interféron lors d'une infection virale ou en présence d'un autre stimulus tel l'ARN double brin, l'ARN double brin synthétique (polyinosine/polycytosine) (poly(I)-poly(C)), des endotoxines et même des substances chimiques inhibant la transcription ou la traduction cellulaire (Flint, 2000). Les interférons sont des cytokines faisant partie d'une famille de glycoprotéines à faible poids moléculaire (14 et 40 kDa) ayant des propriétés antivirales. Elles affectent également d'autres mécanismes importants

comme la régulation de la croissance cellulaire, la différenciation, l'apoptose et possèdent des propriétés immunorégulatrices (Samuel 2001; Lam *et al.*, 2005). Ils sont utilisés lors de traitements anti-cancer (mélanome, carcinome et sarcome de Kaposi) et lors d'infections chroniques du virus de l'hépatite B et C ainsi que pour le traitement du lymphome associé au gammaherpesvirus (Obuchi *et al.* 2003).

Ils sont classés en deux types; I : IFN- $\alpha/\beta/\omega$ (IFN viraux) et II : IFN- γ (IFN immun) (Balachandran *et al.* 2000; Samuel 2001; Obuchi *et al.* 2003). Il existe aussi l'IFN- τ et l'IFN- δ qui sont distribués dans peu d'espèces bovines et ils servent lors de la transduction d'un signal par le placenta en développement (Lefèvre *et al.* 1998). Les interférons humains sont fabriqués par des leucocytes, des macrophages, des cellules épithéliales et des fibroblastes en réponse à une infection virale (surtout IFN- α/β) ou par d'autres stimuli pathogènes (Algarte *et al.* 1999). L'IFN- γ est surtout produit par les lymphocytes T et les cellules NK (natural killer) lors de stimuli mitogéniques ou antigéniques (Samuel 2001; Obuchi *et al.* 2003). Il y a un grand nombre de gènes d'interférons viraux (13 pour IFN- α , 1 pour IFN- β et 1 pour IFN- ω) situés sur le chromosome 9 chez l'humain et le chromosome 4 chez la souris (Samuel 2001).

Les interférons exercent leurs propriétés en induisant l'expression de plusieurs gènes cellulaires, dont la protéine sérine/thréonine kinase dépendante de l'ARN double brin (PKR). Cette enzyme s'autophosphoryle et catalyse la phosphorylation de substrats tels la sous-unité alpha du facteur d'initiation 2 (eIF2 α). Cette phosphorylation cause une diminution de la synthèse protéique dans la cellule. Les interférons α/β sont également des médiateurs de l'apoptose. Les interférons seuls n'induisent pas la mort cellulaire programmée; ils ont besoin d'un traitement combiné avec l'ARN double brin. Ceux-ci vont alors pouvoir induire la PKR et l'ARNase L 2-5A-dépendante. L'induction de l'apoptose par cette voie implique eIF2 α et NF- κ B (Samuel 2001).

Les interférons α et β sont des molécules qui aident à la survie d'un organisme lors d'une infection virale. C'est pourquoi nombreux virus ont développé des mécanismes pour inhiber l'IFN. Par exemple, le poliovirus inhibe la sécrétion des protéines, plus précisément d'interleukines et de l'IFN- β (Dodd *et al.*, 2001). Cette fonction cellulaire n'est pas requise pour la réplication virale, mais diminue la quantité de cytokines pro inflammatoires et antivirales sécrétées, diminuant alors la réponse antivirale chez l'hôte infecté. Les Poxvirus produisent, lors de l'infection, des molécules qui miment des récepteurs de l'IFN. Ces molécules se lient alors à l'IFN prévenant ainsi la réponse antivirale que pourrait induire l'IFN chez les cellules hôtes (Samuel 2001). La protéine E6 du virus du papillome humain (VPH) se lie sélectivement à IRF-3 et faiblement à d'autres IRF, incluant IRF-2 et IRF-9. Cette association de E6 et IRF-3 inhibe la transactivation permettant au VPH de contourner la réponse antivirale (Samuel, 2001).

1.2 Induction de l'interféron- β

La principale molécule inductrice d'interféron- β est l'ARN double brin produit lors de la réplication virale et cette induction peut être mimée par l'ARN double brin synthétique poly (I)-poly(C). Le promoteur intact de l'IFN- β est activé par l'infection virale et cette activation du gène de l'interféron ne nécessite pas la synthèse protéique, mais la répression post-induction en a besoin (Thanos 1996). Le promoteur de l'interféron β est composé de quatre domaines appelés régulateurs positifs (PRD) I à IV et d'un domaine négatif (NRD). L'activation du gène de l'IFN- β par les virus nécessite la présence d'au moins deux domaines ou copies d'un d'eux (Du *et al.* 1993; Thanos 1996). Il y a un agencement spécifique de différents facteurs de transcription sur le promoteur de l'IFN- β . Dans les cellules non induites, le facteur régulateur de l'IFN 2 (IRF-2) masque les domaines PRDI et PRDIII. Lors de

l'induction virale, il y a un changement du ratio IRF-1/IRF-2 du à l'augmentation de IRF-1 qui finit par se lier aux éléments PRDI et PRDIII. IRF-1 agit donc comme un activateur et IRF-2 serait un répresseur du gène de l'IFN- β . Selon plusieurs observations, il existerait la voie dépendante de IRF-1 et indépendante de IRF-1 pour ce qui est de l'induction virale du gène de l'IFN- β , mais les avis sont mitigés (Thanos 1996; Reis *et al.*, 1992). Cependant, la majorité des études montrent que IRF-1 est essentiel lors de l'activation de la transcription du gène de l'IFN- β . Mais, IRF-1 à lui seul ne peut pas activer l'expression de l'IFN (Reis *et al.*, 1992; Leblanc *et al.*, 1990). Ensuite, l'élément PRDIV contient des sites de liaisons pour plus d'une protéine. Il y a la liaison d'un homodimère du facteur d'activation de la transcription 2 (ATF-2) ou de l'hétérodimère ATF-2/*c-jun*. Ce sont des protéines exprimées constitutivement dans presque tous les types cellulaires et l'induction virale ou par l'ARN double brin ne nécessite pas de nouvelle synthèse protéique. ATF-2 est phosphorylé pour se lier à l'ADN (Du *et al.*, 1993) par la kinase p38 qui est elle-même phosphorylée par la kinase MEK-6 (Ricote *et al.*, 2006). Ces deux enzymes font partie de la famille des MAP kinases. Ces kinases régulent plusieurs mécanismes cellulaires, dont l'embryogenèse, la prolifération, la différenciation et l'apoptose chez les cellules eucaryotes (Buzzi *et al.*, 2010). La protéine de haute mobilité, HMG I(Y) se lie aussi à l'élément PRDIV. Cette protéine fait partie d'une famille de protéines de faible poids moléculaire qui originellement ont été découvertes pour leur association à la chromatine. En fait, il existe trois sites de liaison de HMG I (Y) sur le promoteur de l'IFN- β . Finalement, la liaison du facteur de transcription nucléaire NF- κ B à PRDII est **l'étape clef** de l'activation virale du gène de l'IFN- β (Du *et al.* 1993; Thanos et Maniatis 1995; Boulares *et al.* 1996; Thanos 1996). La liaison du NF- κ B à l'ADN se fait sur la séquence κ B (5'-GGGAAATTCC-3') de l'élément PRDII du gène de l'IFN- β (Leblanc *et al.* 1990; Grimm et Baeuerle 1993; Thanos et Maniatis 1995; Algarté *et al.* 1999). La protéine HMG I (Y) est aussi essentielle lors de la liaison du NF- κ B. Précisément, NF- κ B reconnaît la partie riche en GC à la fin de ce site et HMG I (Y) reconnaît la partie riche en AT du centre de la région (Thanos et Maniatis

1995). Des études ont démontré que lors d'une infection virale, des mutations qui interfèrent avec la liaison de HMG I (Y) ou NF- κ B diminuent l'activation du gène de l'IFN- β in vivo. Elle n'agit pas comme un activateur transcriptionnel mais plutôt comme un facteur auxiliaire de NF- κ B (Thanos 1996). En fait, HMG I (Y) est essentielle à l'activité de PRDII et PRDIV.

Pour qu'il y ait une activation maximale du promoteur IFN- β , tous ces facteurs de transcription doivent coopérer et former un complexe, appelé «enhanceosome» (Thanos 1996; Nourbakhsh et Hauser, 1999) (figure 1.1). La formation de ce complexe est due en grande partie à la participation de HMG I (Y) qui favorise les interactions ADN-protéine et protéine-protéine (Du *et al.* 1993, Thanos 1996).

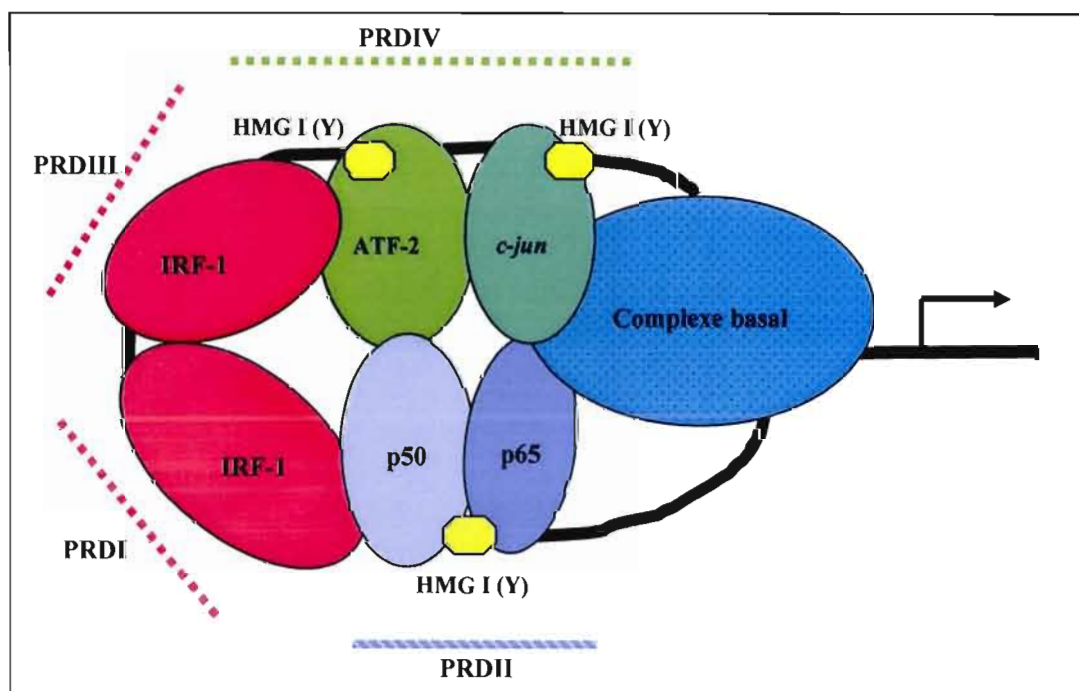


Figure 1.1. Modèle du complexe enhanceosome activant le gène de l'IFN- β . Les grandeurs relatives des protéines et la longueur des domaines d'ADN ne sont pas à l'échelle. (Tirée de Du *et al* 1993)

La régulation transcriptionnelle de l'IFN- β est caractérisée par une répression constitutive et une activation spécifique virale. Le promoteur IFN- β est réprimé constitutivement par un domaine régulateur négatif (NRD), qui contient un élément régulateur négatif (AATTCCTCTGA) appelé NRE (figure 1.2). Des mutations dans cet élément amènent l'induction non virale du promoteur IFN- β . Des études sur la répression par cet NRE révèlent que cet élément se superpose partiellement à PRDII, le site de liaison du NF- κ B dans le promoteur de l'IFN- β . Une étude a identifié et caractérisé une protéine se liant à NRE, appelé NRF (facteur réprimant NF- κ B). Ce NRF abolit toute activité transcriptionnelle des sites de liaison à NF- κ B par un mécanisme particulier. *In vitro*, cette protéine se lierait par une interaction protéine-protéine à NF- κ B. Il s'agit en fait d'une protéine nucléaire. Il a été démontré que l'inhibition du NF- κ B, médiée par NRF, est un composant important du «silencing» de l'IFN- β avant l'activation virale (Nourbakhsh et Hauser, 1999; Froese *et al.*, 2006). NF- κ B est donc important dans l'expression du gène de l'interféron- β . Toutefois, il a été démontré que NF- κ B n'est pas suffisant à lui seul pour activer la transcription du gène de l'IFN- β (Leblanc *et al.*, 1990). Il est maintenant connu que le facteur régulateur de l'IFN 3 (IRF-3) est aussi important que NF- κ B dans l'induction de l'IFN- β (Lin *et al.*, 2005).

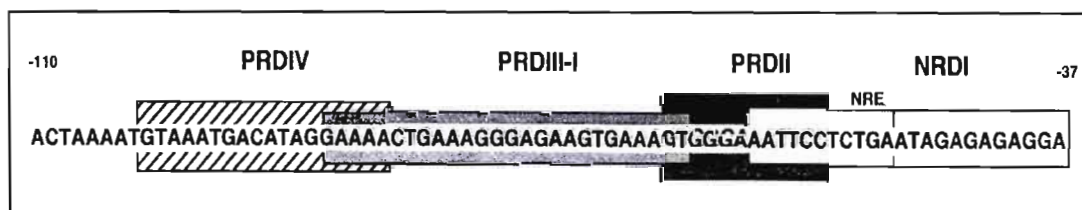


Figure 1.2. Organisation des domaines PRD, NRD et de l'élément NRE dans la séquence du promoteur de l'IFN- β . (Tirée de Thanos 1996)

1.3 Le facteur de transcription nucléaire kappa-B : NF- κ B

Le facteur nucléaire kappa B (NF- κ B) joue un rôle important dans la régulation d'un grand nombre de gènes codant pour des cytokines, des gènes immuno-régulateurs, des récepteurs et plusieurs gènes précoces de certains virus. La liaison du NF- κ B à l'ADN de manière spécifique au domaine régulateur positif PRDII (Lenardo *et al.* 1989; Du *et al.* 1993; Boulares *et al.* 1996; Thanos 1996) est inductible dans plusieurs types cellulaires par des virus, de l'ARN double brin naturel et synthétique, des cytokines (Algarte *et al.* 1999), des bactéries et des facteurs de stress (Grimm et Baeuerle 1993; Beg *et al.* 1993). Dû à son rôle important dans la réponse immune, NF- κ B a été appelé le médiateur central de la réponse immune (Hiscott *et al.* 2001). De plus, une régulation inappropriée du NF- κ B est impliquée dans plusieurs désordres pathologiques humains comme les cancers, l'arthrite, des maladies affectant le système nerveux, l'asthme, l'ataxia telangiectasia et autres maladies impliquant l'inflammation (Baldwin Jr., 1996; Karin et Ben-Neriah, 2000).

NF- κ B a été identifié en 1986 comme un facteur nucléaire qui se lie à un élément «enhancer» de la chaîne légère kappa (κ) du gène de l'immunoglobuline (Ig) et qui, on croyait, s'exprimait dans les cellules B spécifiquement (Sen et Baltimore 1986). Il est clair maintenant que NF- κ B est présent dans tous les types cellulaires sous une forme inactive retenue au cytoplasme par un inhibiteur kappa B (I κ B). NF- κ B est un dimère formé de deux protéines faisant partie d'une famille caractérisée par le fait que tous ses membres possèdent une région de 300 acides aminés appelée domaine d'homologie *Rel* (RHD). Il existe cinq protéines identifiées chez les mammifères, NF- κ B1 (p50), NF- κ B2(p52), c-Rel, RelA (p65) et RelB, ainsi que deux protéines chez la Drosophile; dorsal et Dif (Thanos et Maniatis 1995; DeLuca *et al.* 1996; Baldwin Jr. 1996; Karin et Ben-Neriah 2000). Ces protéines sont divisées en deux groupes, celles provenant de précurseurs (p50 et p52) et les autres n'en n'ayant

pas (c-Rel, p65, RelB, dorsal et Dif). Les membres des deux groupes peuvent former entre eux des homo- et/ou hétéro-dimères. L'hétérodimère p50/p65 est la forme de NF- κ B la plus abondante dans les cellules (figure 1.3). Conséquemment, le terme NF- κ B implique toujours, dans le cas présent, le complexe p50/p65.

NF- κ B représente une cible de choix pour les pathogènes viraux. Son activation est rapide et donne lieu à une stimulation transcriptionnelle forte de plusieurs gènes précoces viraux et plusieurs gènes cellulaires aussi. Il a aussi une influence sur le cycle cellulaire car plusieurs de ses gènes cibles sont des facteurs de croissance et des proto-oncogènes. De plus, plusieurs virus exploitent ses propriétés antiapoptotiques pour échapper au système immunitaire ou au contraire pour provoquer l'apoptose et favoriser l'infection (Hiscott *et al.*, 2001). L'activation du NF- κ B peut se faire à deux endroits; lors du relâchement par I κ B pour permettre la liaison à l'ADN et lors de la translocation nucléaire (Baeuerle et Baltimore, 1988). Celle qui est d'intérêt particulier ici est l'activation de NF- κ B contrôlée par la sous-unité inhibitrice I κ B, celle-ci doit subir une phosphorylation, une ubiquitination et une dégradation pour exposer la séquence de localisation nucléaire du NF- κ B.

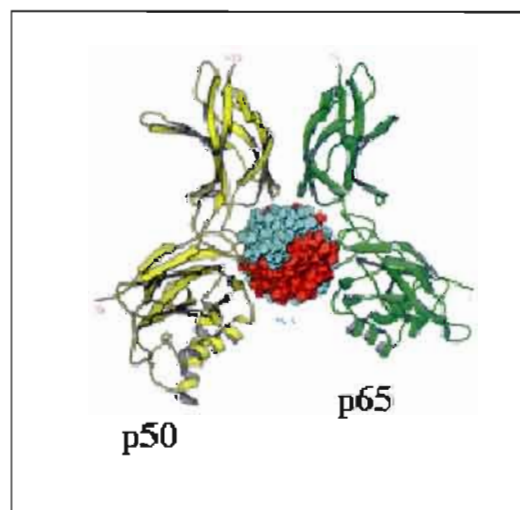


Figure 1.3. Structure du complexe formé par NF- κ B et la région κ B du gène de l'IFN- β . (Tirée de Berkowitz *et al.* 2002)

1.4 I κ B : inhibiteur spécifique du NF- κ B

L'inhibiteur kappa B (I κ B) est celui qui garde le facteur NF- κ B dans le cytoplasme en masquant sa séquence de localisation nucléaire (NLS) (Steffan *et al.*, 1995; Boulares *et al.*, 1996; Delhase *et al.*, 1999) l'empêchant ainsi d'être transporté au noyau pour aller se lier à l'ADN et activer les gènes cibles. Donc, il inhibe la liaison à l'ADN et l'entrée dans le noyau des sous-unités liant l'ADN. Un autre rôle possible pour I κ B serait qu'il régule à la baisse l'expression des gènes dépendants des sites κ B, mais il reste encore de la recherche à faire pour le confirmer. Il existe plusieurs molécules inhibitrices du NF- κ B dont I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ , Bcl-3, les précurseurs p105 (NF- κ B1) et p100 (NF- κ B2) et chez la drosophile, Cactus. Toutes ces molécules possèdent une région riche en ankyrines qui est impliquée dans la liaison à la région RHD du NF- κ B et elle masque également le NLS. Les inhibiteurs les plus importants chez les mammifères sont I κ B α , I κ B β et I κ B ϵ . Ils possèdent la région N-terminale nécessaire à la dégradation induite par un stimulus et sont dits les «I κ B professionnels» (Karin et Ben-Neriah, 2000). Ces inhibiteurs lient plus efficacement la sous-unité p65 que la sous-unité p50 de NF- κ B (Grimm et Baeuerle, 1993). Le mécanisme d'action de ces protéines est différent pour chacune d'elles (Tam et Sen, 2001).

La protéine I κ B α est l'inhibiteur caractéristique du NF- κ B et elle est phosphorylée sur les résidus sérine 32-36 par une I κ B kinase (IKK). Son poids moléculaire est de 37 kDa. La protéine I κ B β a un poids moléculaire de 43 kDa et est phosphorylée sur les résidus sérine 19-23 (Mercurio *et al.*, 1997; Renard *et al.*, 2000). Ces deux inhibiteurs partagent plusieurs caractéristiques communes et répondent différemment à différents inducteurs. Par exemple, le niveau de I κ B β n'est pas affecté par le facteur onconécrosant (TNF- α), contrairement à I κ B α , et sa dégradation est plus lente que celle de I κ B α . De plus, I κ B α est un inhibiteur plus fort de NF- κ B

que $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ (Algarté *et al.*, 1999), qui peut agir comme protéine chaperonne protégeant le complexe NF- κ B-ADN de la dissociation par $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ et aidant ainsi à maintenir l'activité NF- κ B dans les cellules (Hiscott *et al.*, 2001). Une autre différence est que $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ ne s'accumule pas dans le noyau suite à l'activation de NF- κ B, tandis que $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ s'y accumule et se lie à NF- κ B pour l'inhiber à nouveau (Baldwin Jr., 1996). Dû au rôle inhibiteur plus important pour $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, il ne sera question que de cette protéine dans le cas présent.

1.5 Les $\text{I}\kappa\text{B}$ kinases

Les kinases IKK forment un complexe de 700-900 kDa (appelé «signalsome») composé de $\text{IKK}\alpha$, $\text{IKK}\beta$ et $\text{IKK}\gamma$ (appelé aussi NEMO). $\text{IKK}\alpha$ (85 kDa) et $\text{IKK}\beta$ (87 kDa) sont des sérine-thréonine kinases qui sont très homologues et qui contiennent un domaine N-terminal de protéine kinase ainsi qu'un zipper de leucine qui facilite les homo- et hétérodimérisations. Elles possèdent aussi un motif hélice-boucle-hélice (HBH). Ce sont les sous-unité catalytiques du complexe. $\text{IKK}\gamma$ (48 kDa) est une protéine qui sert à maintenir les trois protéines en complexe et qui est essentielle à la réaction du complexe à un signal (Mercurio *et al.*, 1997; Karin et Ben-Neriah, 2000; Heissmeyer *et al.*, 2001; Gustin *et al.*, 2004).

Afin d'être activé, le complexe doit être phosphorylé. $\text{IKK}\alpha$ et $\text{IKK}\beta$ possèdent une boucle d'activation dans leurs domaines kinase qui contiennent des sites où une phosphorylation amène un changement conformationnel et donc l'activation du complexe. Ces sites sont les sérines 177 et 181 pour $\text{IKK}\beta$ et les sérines 176 et 180 pour $\text{IKK}\alpha$. De plus, la phosphorylation de $\text{IKK}\alpha$ est importante pour l'activation mais celle-ci est dépendante de la phosphorylation de $\text{IKK}\beta$. En effet, même si ces deux protéines sont activées dans le complexe IKK, elles ont des fonctions différentes. $\text{IKK}\alpha$ joue un rôle majeur dans la différenciation de l'épiderme et également dans l'activation du complexe IKK, mais $\text{IKK}\beta$ est la sous-unité requise

pour l'activation du NF- κ B en réponse à des stimuli proinflammatoires (Delhase *et al.*, 1999). Une autre région jouant un rôle dans l'activation du complexe est le motif HBH qui interagit avec le domaine kinase ayant été phosphorylé. Ce complexe est phosphorylé par plusieurs kinases dont la protéine kinase C, les membres de la familles des protéines activées par des agents mitogènes (MAP) kinase (K) kinase kinase (MAPKKK), par la kinase induisant NF- κ B (NIK), par AKT/PKB et par plusieurs autres. Un point important à retenir est que l'activité du complexe IKK est limitante pour l'activation du NF- κ B, car des essais *in vitro* ont montré qu'une diminution de l'activité kinase peut diminuer considérablement la dégradation de I κ B et l'activation du NF- κ B (Karin et Ben-Neriah, 2000).

Après avoir été phosphorylé par IKK, I κ B α est reconnu par la F-box/WD40 E3RS^{I κ B}/ β -TrCP (protéine contenant des répétitions de β -transducine), qui entraîne l'ubiquitination aux résidus lysine 21 et 22 amenant la dégradation de I κ B α par le protéasome 26S et donc le relâchement du NF- κ B (Yaron *et al.*, 1997; Maniatis, 1999; Spencer *et al.*, 1999; Karin et Ben-Neriah, 2000). Celui-ci s'accumule alors dans le noyau, où il stimule la transcription de gènes contenant la séquence consensus particulière (Hiscott *et al.*, 2001; Renard *et al.*, 2000).

Il n'y a pas seulement que dans le cytoplasme que I κ B peut inhiber NF- κ B. Comme mentionné avant, il y a aussi une inhibition dans le noyau. I κ B libre a la capacité d'entrer dans le noyau à l'aide d'une séquence d'importation nucléaire. Il peut alors soit se lier à NF- κ B libre dans le noyau pour empêcher sa liaison à l'ADN, soit dissocier NF- κ B de l'ADN (Sachdev *et al.*, 1998). Il existe une boucle d'autorégulation entre NF- κ B et I κ B α car le promoteur de ce dernier possède un site κ B où vient se lier NF- κ B qui l'induit (Chiao *et al.*, 1994). Les complexes NF- κ B/I κ B α nouvellement formés peuvent se déplacer du cytoplasme au noyau et vice versa grâce au NLS et à la séquence d'exportation nucléaire (NES) (Huang *et al.*, 2000). En fait, ces mécanismes peuvent être considérés comme une régulation de la

transcription dépendante du NF- κ B.

1.6 Le virus de la stomatite vésiculeuse :VSV.

Le virus de la stomatite vésiculeuse a été signalé pour la première fois en 1916 aux Etats-Unis chez le bétail et les chevaux. VSV représente la famille des *Rhabdoviridae*, de l'ordre des *Mononegavirus* (figure 1.4). Cette famille virale possède un large spectre d'hôtes, incluant les plantes, les insectes et les vertébrés. Le VSV est un virus en forme de balle de fusil, enveloppé à ARN simple brin de polarité négative. Son génome est de 11.1 Kb. Il existe plusieurs sérotypes de VSV, mais ceux qui sont le plus souvent étudiés en laboratoire sont les sérotypes VSV Indiana (VSVI) et VSV New Jersey (VSVNJ). Ce virus peut infecter une grande variété d'animaux, incluant les mammifères et les invertébrés. Naturellement il infecte les chevaux, les porcs et le bétail et infecte rarement les moutons et les chèvres. Il peut être transmis à l'aide de vecteurs comme les mouches de sable et les moustiques (Rieder et Conzelmann, 2009; Licata et Harty, 2003). Il cause une fièvre et la formation de vésicules dans la bouche et sur les lèvres. Chez l'humain, il peut causer des symptômes semblables à ceux causés par le virus Influenza jusqu'à une encéphalite (de Mattos *et al.*, 2001). En effet, lorsque inoculé par voie intranasale chez des souris, VSV accède rapidement au système nerveux central (SNC) où il se réplique. La capacité de se répliquer dans le SNC n'est pas encore comprise, mais des recherches se font en ce sens (Trottier *et al.*, 2005). Il y a des épidémies de stomatite vésiculeuse chez les animaux à chaque année au sud-est des États-Unis. Il y en a aussi en Amérique du Sud et Centrale, ainsi qu'au Mexique (Rodriguez, 2002).

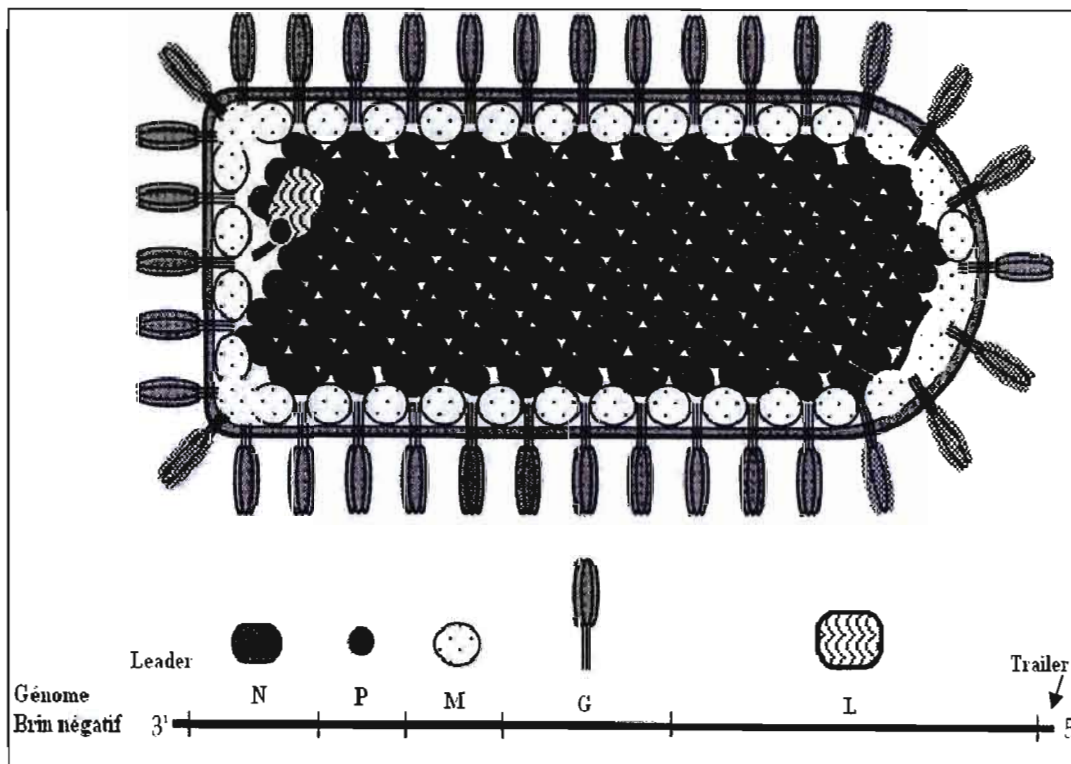


Figure 1.4. Représentation schématique de la particule virale de VSV ainsi que de l'ordre dans le génome, des protéines exprimées représentées par les différents symboles. (D'après Rose et Whitt 2001)

Néanmoins, VSV ne présente pas seulement des désavantages, il possède des caractéristiques qui le rendent utile pour d'autres aspects scientifiques importants. Par exemple, des études sont effectuées dans le but de l'utiliser en tant que vecteur lors d'une vaccination contre des virus causant des maladies graves comme le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Rose *et al.*, 2001), le papillomavirus qui peut conduire au cancer de l'utérus (Roberts *et al.*, 2004), et nouvellement un vaccin atténué de VSV contre le coronavirus causant le syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS) (Kapadia *et al.*, 2005). VSV pourrait devenir également un agent anti-cancer redoutable pour les cellules cancéreuses dont le système interféron est défectueux

(Balachandran *et al.*, 2001; Obuchi *et al.*, 2003; Barber, 2004). En effet, une des caractéristiques de VSV, cruciale dans ce cas-ci, est qu'il est très sensible à l'action des interférons. Il y a donc plusieurs études qui témoignent de l'importance de la recherche sur ce virus.

Le génome de VSV code pour cinq ARN messagers (ARN_m) différents coiffés et polyadénylés qui codent pour cinq protéines virales (figure 1.4). Il contient une séquence leader de 50 nucléotides qui précède le gène N et une région non traduite de 60 nucléotides localisée après le gène L. Dans l'ordre, les cinq ARN_m sont; 3'-N-P-M-G-L-5', pour la souche Indiana. La protéine de la nucléocapside ou nucléoprotéine (N) possède 422 acides aminés (a.a.) (VSVNJ) et elle est l'antigène commun de tous les virus du genre *Vesiculovirus*. Elle protège le matériel génétique du virus contre les ribonucléases. La phosphoprotéine (P) renferme 274 a.a. (VSVI et VSVNJ) et la séquence du polypeptide est différente entre les sérotypes Indiana et New Jersey. Elle forme un complexe avec la protéine L, une ARN polymérase-ARN-dépendante, et ce complexe possède l'activité transcriptase. La protéine L est la plus grande protéine de VSV; elle possède 2 109 a.a. et elle est aussi responsable du coiffage 5', de la méthylation et de la polyadénylation des ARN viraux. La protéine de la matrice (M) est la plus petite (229 a.a.) et la plus abondante de toutes les protéines produites par VSV. Elle possède plusieurs fonctions dont la principale est de lier l'ARN viral et la ribonucléoprotéine condensés du virus à la membrane plasmique de l'hôte pendant le processus de bourgeonnement (Ahmed et Lyles, 1998). Enfin, la glycoprotéine (G) de l'enveloppe est l'antigène spécifique au sérotype de VSV. La protéine G de VSVI possède 511 a.a. et celle de VSVNJ, 517 a.a.. Elles détiennent 50% d'homologie. Elle est divisée en trois domaines structuraux ; le domaine cytoplasmique, le domaine transmembranaire et finalement le domaine antigénique (de Mattos *et al.* 2001). Le gène de la protéine P code également pour deux autres protéines appelées C et C'. Elles sont conservées dans tous les *Vesiculovirus* et semblent être impliquées dans la pathogenèse virale ou la

transmission par des insectes, mais ne sont pas nécessaires à la croissance sur une culture de tissu (Rose et Whitt 2001).

1.6.1 Réplication de VSV

Il existe plusieurs virus dont le tropisme est dirigé par un récepteur cellulaire spécifique. Par exemple, le virus du VIH a un tropisme pour les cellules T ou les macrophages ayant le récepteur CD4 à la surface membranaire. VSV semble ne pas avoir de récepteur spécifique le contraignant à infecter et se répliquer dans un type cellulaire. Il utilise plutôt une variété de molécules polycationiques ou polyanioniques présentes à la surface cellulaire pour s'attacher à la membrane. Par contre, plusieurs études ont montré un neurotropisme chez les animaux (Durbin *et al.*, 2002; Trottier *et al.*, 2005; Desforges *et al.*, 2002). VSV est un virus qui ne montre pas un tropisme vers les cellules supportant sa réplication, mais plutôt vers les cellules n'étant pas capable d'amorcer un état antiviral par l'IFN α/β (Lyles, 2000).

La réplication de VSV débute par la fusion membranaire dépendante du pH et l'endocytose du virus par la cellule hôte (figure 1.5). La conformation de la nucléoprotéine seule de VSV est très serrée et stable. Dans le virion, elle est sous forme d'une super hélice condensée maintenue par la protéine M. Suite à l'entrée du virus dans la cellule hôte, N est relâchée dans le cytoplasme et gagne une forme détendue, gardant tout de même le matériel génétique viral à l'abri des RNases cellulaires. Les protéines P et L procèdent à leurs fonctions en dégageant temporairement l'ARN viral de la protéine de la nucléocapside. L'ARN viral sert de patron pour deux types de synthèse d'ARN, soit la réplication et la transcription. La réplication est assurée par la protéine L associée avec P et N et la transcription l'est par les protéines L et P. La réplication commence à l'extrémité 3' du génome viral

ou de l'antigénome, amenant l'encapsulation des nouveaux ARN viraux synthétisés avec la protéine N. Afin que la réplication soit continue, suffisamment de protéine N doit être accumulée. Pour ce faire, l'ARN négatif viral est transcrit en cinq ARNm correspondants aux cinq protéines de VSV. Les ARNm des protéines N, P, M et L sont traduits par les ribosomes libres dans le cytoplasme cellulaire, tandis que l'ARNm de G est traduit par les ribosomes liés à la membrane du réticulum endoplasmique. Les protéines N, P et L nouvellement synthétisées participent à la réplication virale qui forme de nouveaux ARN négatifs viraux. Ces nouveaux ARN sont soit encapsulés avec N dans le but de former de nouveaux virions ou ils sont transcrits et traduits en protéines virales. Suite à sa traduction, la protéine G est glycosylée et amenée à la membrane plasmique par la voie de sécrétion. Les protéines M et N sont amenées à la membrane plasmique où l'association avec la protéine G à la surface initie l'assemblage et le bourgeonnement viral (Flint *et al.*, 2000; Rieder et Conzelmann, 2009).

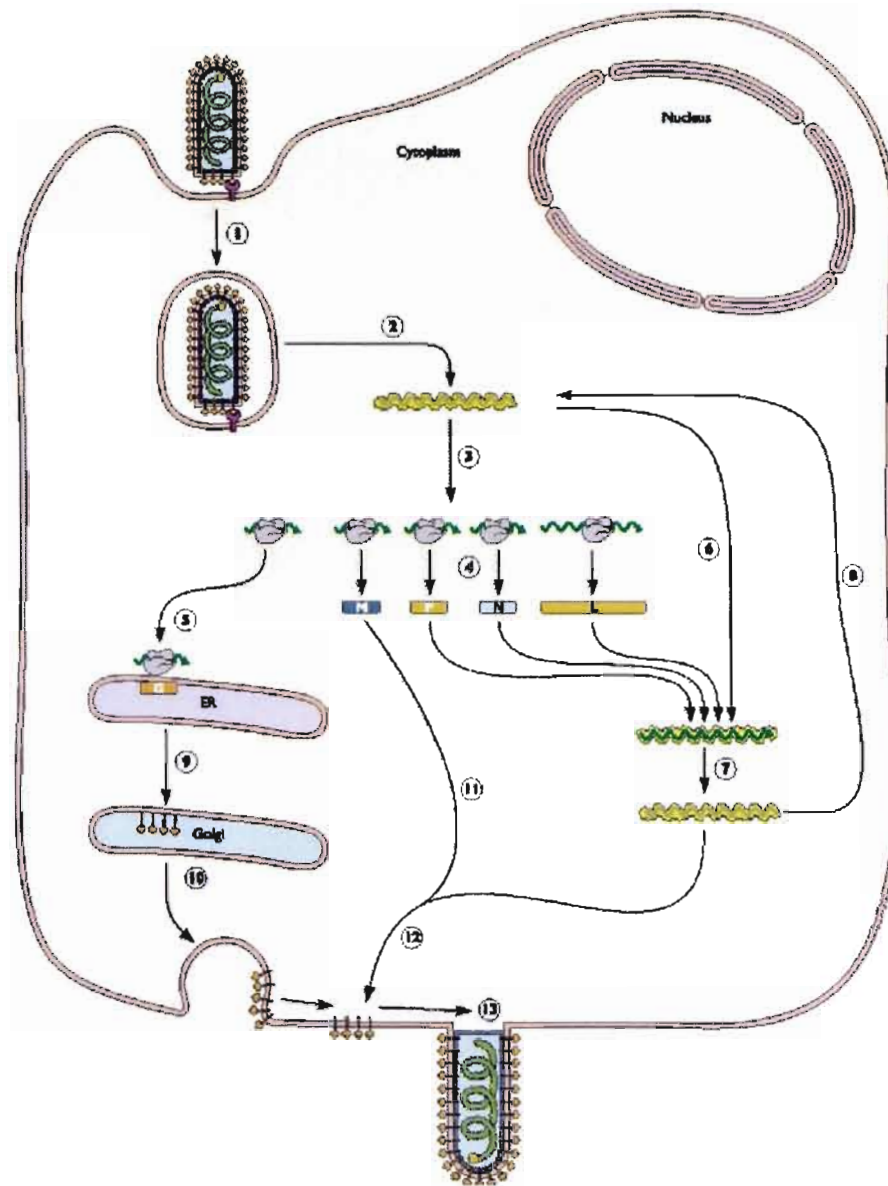


Figure 1.5. Représentation schématique du cycle de réplication de VSV. (Tiré de Flint *et al.*, 2000)

1.6.2 La protéine de la matrice (M) de VSV

Comme mentionné précédemment, la protéine de la matrice possède plusieurs fonctions. Premièrement, elle joue un rôle dans les effets cytopathiques (*cpe*) associés à l'infection par VSV. La protéine M cause l'arrondissement cellulaire en absence des autres composants viraux en interagissant avec la tubuline (Blondel *et al.*, 1990; Melki *et al.*, 1994; Kopecky *et al.*, 2001; Licata et Harty, 2003). Elle est aussi capable d'inhiber la transcription chez l'hôte dirigée par les promoteurs dépendant des trois ARN polymérases en absence d'autres composants viraux (Ahmed et Lyles, 1998; Ahmed *et al.*, 2003). L'inhibition de la transcription par l'ARN polymérase II se fait au niveau de l'initiation. Le facteur TFIID est celui qui est inhibé durant l'infection, plus précisément, au niveau de sa sous unité protéique se liant à la boîte TATA (TBP) (Yuan *et al.*, 1998). Cette inhibition n'est pas due à la réduction du niveau de TFIID, mais plutôt à son inactivation. En effet, une étude a démontré par western blot que la quantité de TFIID reste la même suite à une infection par VSV (Yuan *et al.*, 1998). L'inhibiteur de TFIID n'est pas encore connu (Yuan *et al.*, 2001). La protéine M inhibe aussi la traduction des protéines grâce la combinaison de ses effets et des autres composants viraux (Francoeur *et al.*, 1987; Ahmed *et al.*, 2003) en impliquant les facteurs eIF2- α et le complexe eIF4 (Connor et Lyles, 2005). Cette inhibition se produit également au niveau du transport nucléocytoplasmique des ARN et des protéines (Her *et al.*, 1997; Lyles, 2000; Kopecky *et al.*, 2001; Gustin, 2003). Tous ces *cpe* causés par VSV amènent habituellement la mort cellulaire. Mais la protéine M pourrait induire spécifiquement l'apoptose. En effet, une étude a montré que l'infection par VSV sauvage induit la fragmentation de l'ADN et que l'infection en présence d'un inhibiteur de caspases (ZVAD-fmk) prévient la mort cellulaire (Desforges *et al.*, 2002). Il existerait également une autre composante virale qui induirait l'apoptose et qui n'est pas encore identifiée (Kopecky *et al.*, 2001; Gaddy et Lyles, 2005). Une grande partie des recherches sur VSV portent sur les effets de la protéine M. Des mutants de VSV,

pour la protéine M, ont été étudiés dans le but de comprendre les fonctions de cette protéine lors de l'infection.

1.6.3 Mutants de VSV

Les mutants de VSV ont montré que la fonction de l'assemblage viral et les effets cytopathiques causés par la protéine M ne sont pas liés génétiquement. En effet, la plupart des mutants utilisés contiennent souvent la même mutation dans la séquence de la protéine M, soit la substitution d'une méthionine par une arginine à la position 51 (substitution M51R). Cette mutation rend la protéine non fonctionnelle pour l'inhibition de l'expression des gènes hôtes et non fonctionnelle pour l'inhibition de la synthèse protéique. Cependant, cette mutation permet encore l'assemblage viral adéquat (Black *et al.*, 1993). Les exemples de mutants les plus utilisés sont les suivants : tsO82 (*ts* pour thermosensible), un mutant naturel de la souche Orsay de sérotype Indiana et un virus mutant de la souche HR («heat-resistant») d'Indiana, T1026. Ces mutants sont capables d'établir une infection persistante et la fonction d'inhibition totale de la synthèse protéique est défectueuse (Francoeur *et al.*, 1987; Desforges *et al.*, 2001). De plus, ils sont de bons inducteurs d'interféron (Ferran *et al.*, 1997). Il y a d'autres mutants du VSV qui sont couramment utilisés, dont TP6 qui a été isolé par des essais sur plaque par rapport à la production d'interféron (PIF). Le «T» est pour «Toronto» et le «P» est pour la fonction qui résulte en l'inhibition totale de synthèse protéique virale et cellulaire chez les cellules infectées. Le mutant TP6 est P^{++} et PIF^{+} , il est un très bon inhibiteur de la synthèse protéique (P^{++}) et un bon inducteur d'interféron (PIF^{+}). T1026 est P^{-} et PIF^{+} car il y a synthèse protéique (P^{-}) cellulaire et virale chez les cellules infectées et il produit des plaques dont la croissance est arrêtée parce que l'IFN est induit (PIF^{+}) par les cellules entourant les plaques qui présentent un état antiviral (Francoeur *et al.*, 1987).

1.7 PROJET DE RECHERCHE.

Le virus de la stomatite vésiculeuse (VSV) possède une protéine de la matrice (M) qui inhibe la synthèse d'ARN et la synthèse protéique de l'hôte infecté et elle joue aussi un rôle important dans le cycle viral du VSV. La transcription cellulaire est inhibée au niveau des trois polymérases et dans le cas de la polymérase II l'inactivation est au niveau du facteur de transcription TFIID. Ce facteur joue un rôle central dans la transcription basale et activée et il est donc une bonne cible pour les virus qui inhibent la transcription générale de l'hôte (Lyles, 2000). La protéine M inhibe la transcription générale de l'hôte en même temps qu'elle inhibe la transcription du gène de l'interféron (IFN) (Ahmed *et al.*, 2003). Les interférons sont reconnus comme des cytokines responsables de l'état antiviral chez les cellules de l'hôte (Stojdl *et al.*, 2000). Il serait possible que la protéine M inhibe des étapes additionnelles dans la production d'interféron en amont du facteur de transcription général TFIID. Par exemple, le facteur de transcription nucléaire κB (NF- κB) doit être activé pour qu'il y ait transcription du gène de l'IFN. La transcription du NF- κB est réduite dans les cellules infectées par VSV de type sauvage en comparaison aux cellules infectées par un virus mutant de VSV, T1026. Ceci suggère que l'action de la protéine M sur l'inhibition de la transcription de NF- κB pourrait être ce qui est responsable de l'inhibition de l'expression du gène de l'interféron (Ahmed *et al.*, 2003)

Cependant, une autre étude a démontré que NF- κB peut être activé par VSV de type sauvage après que celui-ci ait déjà éteint la transcription générale des gènes de l'hôte. Ce fait a amené la possibilité qu'un inhibiteur de l'activation du NF- κB existe. D'après cette même recherche, il serait alors possible que le gène de l'IFN soit régulé au niveau de sa transcription et de son induction. Chez le virus T1026R1, des gènes défectueux pourraient agir à ces deux niveaux et alors permettre la transcription du gène de l'IFN (Ferran et Lucas-Lenard, 1997). Lors d'une infection

par le VSV de type sauvage chez des cellules L murines, il n'y a pas d'activation de NF- κ B pendant les premières heures de l'infection, ce qui pourrait être une explication de la suppression de l'induction du gène de l'IFN en sachant que l'activation de NF- κ B est nécessaire. De plus, il existe une corrélation entre la dégradation d'I κ B et l'activation de NF- κ B dans les cellules infectées par le virus T1026R1, donc I κ B est phosphorylé car il s'agit d'une exigence pour sa dégradation. Il n'y a pas de dégradation de I κ B dans les cellules infectées par le type sauvage de VSV, dans les mêmes conditions où NF- κ B n'est pas activé. Cette inactivation de NF- κ B peut résulter du fait que I κ B n'est pas phosphorylé. Alors, l'inhibiteur de l'activation de NF- κ B pourrait agir en régulant la phosphorylation d'I κ B (Boulares *et al.*, 1996). La question est de savoir si le VSV inhibe l'expression du gène de l'interféron par l'intermédiaire de NF- κ B? Cette inhibition provient-elle du fait que la protéine M inhibe la phosphorylation d'I κ B ou y a-t-il un autre inhibiteur viral ou cellulaire?

D'après les études antérieures et la théorie, plusieurs hypothèses doivent être vérifiées. Premièrement, il a été assumé que le résultat de l'infection du VSV sur l'expression de l'IFN- β est connu. En effet, plusieurs études ont montré que VSV HR (sauvage) inhibe l'expression de l'IFN- β et les virus mutants TP6 et T1026 permettent son expression (Ahmed *et al.*, 2003; Ferran et Lucas-Lenard, 1997; Francoeur *et al.*, 1987). À partir de ce fait, une première hypothèse est surgie. Il est possible de croire que les virus TP6 et T1026 permettent l'expression du gène du NF- κ B, tandis que le virus HR l'inhibe. Suite à la première hypothèse, il est envisageable de penser que la sous-unité I κ B α est phosphorylée de manière plus importante lors de l'infection par les virus TP6 et T1026 et moindre lors de l'infection par le virus sauvage.

Afin de pouvoir répondre aux questions et valider les hypothèses, nous avons analysé l'expression du gène du facteur de transcription NF- κ B dans les cellules

infectées par les virus mutant de VSV, soit TP6 et T1026, ainsi que par le virus sauvage HR. Ensuite, une analyse de la phosphorylation d'I κ B α lors de l'infection par les virus HR, TP6 et T1026 a été effectuée.

CHAPITRE II

MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Culture cellulaire

Des cellules HeLa (épithéliales humaines) et L929 (fibroblastes murins) ont été mises en culture dans des plats de Pétri de 10 centimètres (cm) de diamètre à 37°C dans du milieu essentiel minimal alpha (MEM- α) supplémenté de sérum de veau foetal (SVF) à 10%, de 2mM de L-glutamine, de 100 U/ml de pénicilline et de 0.1 mg/ml de streptomycine. Les changements de milieu ont été fait aux deux jours avec du milieu frais et les passages des cellules ont été effectués aux trois à cinq jours, selon la confluence, avec une solution de trypsine à 0.5g/L et d'EDTA à 0.2g/L (Trypsine/EDTA). Les lavages ont toujours été faits avec de la solution saline tamponnée au phosphate (PBS) à des concentrations de 0.01M de tampon phosphate et 0.154 M de chlorure de sodium.

2.2 Souches virales

Les virus utilisés sont le virus sauvage HR, le mutant TP6 (souche HR) et le mutant T1026 (souche HR). Ces virus sont tous de sérotype Indiana et ils sont tous disponibles dans le laboratoire de Laurent Poliquin (Francoeur *et al.* 1987).

2.2.1 Infections

Les cellules ont été infectées à une confluence de 1.0×10^6 cellules, dans des plats de Pétri de 6 cm de diamètre à une multiplicité de 10 unités donnant naissance à une plaque (pfu) par cellule. Les virus ont été dilués dans du PBS froid à la concentration voulue et ils ont été maintenus sur glace. Le milieu des Pétri a été complètement enlevé et un lavage au PBS a été effectué. Par la suite, 200 μ l de suspension virale diluée ont été ajoutés à chaque Pétri et une incubation de 45 minutes a favorisé l'absorption des particules virale par les cellules à infecter. Durant ce temps, les pétri ont été agités doucement pour bien étendre la suspension virale sur toutes les cellules. Par la suite, les cellules ont été lavées avec du PBS tempéré à 37°C pour enlever les particules virales non adhérentes ainsi qu'avec 5 ml de milieu MEM- α avec SVF et P/S. Les cellules infectées ont été incubées à 37°C durant les 12 heures d'infection. Les temps post-infection (p.i.) commençaient à partir de ce point. Le temps 0 heure (hre) correspondait en fait à 45 minutes d'absorption des virus par les cellules. Des récoltes ont été effectuées à 0, 2, 4, 6, 8, 10 et 12 hres p.i. De plus, deux types de témoins ont été utilisés. Un témoin de cellules non infectées (n.i.) dans lequel les cellules ont été mises en contact avec 200 μ l de PBS pendant les 45 minutes d'absorption et un témoin où les cellules n'ont subi aucune infection et elles n'ont servi qu'à s'assurer du nombre de cellules infectées.

2.2.2 Récolte des cellules infectées

Le milieu a été aspiré et un lavage avec du PBS tempéré à 37°C a été effectué. La récolte des cellules a été faite en ajoutant au Pétris 1-2 ml de trypsine/EDTA suivi de 5 minutes d'incubation à 37°C. Du milieu MEM- α avec 10% SVF a été ajouté au Pétri pour inactiver la trypsine/EDTA. Une centrifugation de 5 minutes à 1000 rpm

(300 x g) a servi à isoler les cellules. Les cellules ont été utilisées pour l'extraction d'ARN total ou l'extraction protéique totale.

2.3 Extraction d'ARN total

L'extraction d'ARN a été faite à l'aide du RNeasy Mini Kit de Qiagen, à partir des cellules infectées et non infectées. Après avoir trypsinisé les cellules, elles ont été récoltées et lysées avec un tampon («RLT») contenant du guanidine isothiocyanate et du β -mercaptoéthanol (β -ME) fournit dans le kit d'extraction d'ARN. Les cellules ont été homogénéisées à l'aide d'une colonne QIAshredder de Qiagen. Ceci s'est fait déposant les cellules sur une colonne, elle-même déposée sur un tube collecteur et en centrifugeant 2 minutes (min) à vitesse maximale d'une microcentrifugeuse. Ensuite un volume égal d'éthanol a été ajouté pour favoriser la liaison de l'ARN à la colonne de silica-gel du kit d'extraction. L'échantillon a été déposé dans la colonne d'isolation d'ARN. Une centrifugation de 15 secondes (sec) à $\geq 10\,000$ rpm ($\geq 8000 \times g$) a été effectuée. Seul l'ARN total cellulaire se lie à la colonne et les contaminants sont éliminés efficacement. Le tampon RW1 fourni dans le kit a servi à laver la colonne 15 sec à $\geq 10\,000$ rpm ($\geq 8000 \times g$). Deux derniers lavages ont été effectués avec un autre tampon contenant de l'éthanol, fournit dans le kit (RPE) afin de bien assécher la membrane de la colonne. Finalement, la colonne a été déposée sur un tube collecteur et 30 à 50 μ l d'eau sans ARNase y ont été ajoutés. Pour éluer, une centrifugation de 1 min à $\geq 10\,000$ rpm ($\geq 8000 \times g$) a été effectuée.

2.3.1 Quantification, vérification de la pureté de l'ARN total et conservation

La concentration d'ARN a été déterminée en mesurant l'absorbance à 260 nm (A_{260}) en sachant qu'une unité d'absorbance à 260 nm correspond à 40 µg d'ARN/ml. La pureté a été déterminée en faisant le rapport de l'absorbance à 260 nm sur l'absorbance mesurée à 280 nm (A_{260}/A_{280}). Le rapport devait être entre 1.7 et 2.0. L'ARN a été conservé à -70°C durant une durée maximale d'un an.

2.4 Amplification en chaîne par la polymérase en temps réel (Real time PCR)

2.4.1 Contexte théorique

La PCR en temps réel est une nouvelle technologie alliant efficacité et rapidité. Son invention a écarté les variabilités traditionnelles liées à la PCR quantitative classique. Elle implique la détection et la quantification d'un reporter fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits pendant la réaction de PCR. L'émission est mesurée durant l'étape d'amplification. Il y a deux manières générales de détecter quantitativement les amplicons; par les agents liant l'ADN double brin (SYBRgreen 1) et les sondes fluorescentes. Les kits *QuantiTect Gene Expression Assay* de Qiagen ont recours à la technologie de l'hydrolyse des sondes fluorescentes (*QuantiProbes*). De manière plus précise, les sondes sont spécifiques à la séquence du gène recherché (ici : NF- κ B), elles possèdent à l'extrémité 5' un fluorochrome émetteur (reporter) (FAM : 6-carboxyfluorocéine) et à l'extrémité 3' un fluorochrome suppresseur (quencher). De plus, pour ce qui est de ce kit, les sondes ont un *minor groove binder* (MGB) qui prévient le clivage de la sonde par l'activité ADN polymérase Taq 5'→3' pendant la phase d'élongation. La sonde est seulement déplacée sur la matrice. Ce MGB

augmente la stabilité de la sonde et permet l'utilisation de sondes plus courtes. Les sondes possèdent aussi des Superbases. Celles-ci forment des liaisons avec leurs bases complémentaires comparables aux liaisons GC. Le kit de Qiagen est fourni avec tous les tampons, les enzymes et même l'eau nécessaires à la réaction de PCR dans le LightCycler de Roche, qui est la machine de PCR. Il est question de suivre à la lettre le protocole correspondant à la réaction de PCR et de transcriptase inverse en une étape dans le feuillet d'instructions du kit de Qiagen.

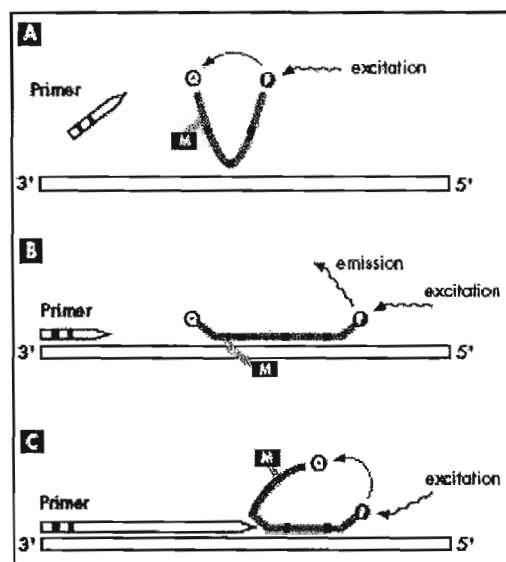


Figure 2.1. Représentation du principe des sondes fluorescentes de Qiagen. **A :** Lorsque la sonde n'est pas liée au gène cible, le fluorochrome est attaché au *quencher*. **B :** Pendant l'appariement de la sonde, le *quencher* et le fluorochrome se séparent permettant l'émission de fluorescence. **C :** Durant l'élongation, la sonde est déplacée du gène cible, le *quencher* et le fluorochrome sont proches ce qui éteint le signal de fluorescence. (Tirée de *QuantiTect Gene Expression Assay Handbook* de Qiagen, 2003)

2.4.2 Réaction de transcriptase inverse et de PCR en une étape avec le système *Light Cycler* de Roche.

La première étape a été de choisir un gène de référence pour faire la quantification relative du gène du NF- κ B, plus précisément la sous-unité p50. Le gène de référence choisi a été l'hypoxanthine guanine phosphoribosyle transférase 1 (Hprt1). Ce gène a été utilisé pour la quantification relative de plusieurs gènes et beaucoup de littérature existe à son sujet. Il s'agit d'un gène dont l'expression est moyennement abondante qui est le niveau d'expression correspondant à NF- κ B.

Ensuite, une courbe standard pour NF- κ B et pour le gène HPRT ont été générées en utilisant cinq dilutions de l'ARN total (non dilué, 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10 000) en triplicata. La réaction de *OneStep PCR* a été réalisée en suivant le protocole de Qiagen. Un volume total de 20 μ l a été déposé dans chaque capillaire contenant une quantité égale à 1 μ g d'ARN. Les volumes de chaque réactif qui ont été utilisés sont ceux inscrits dans le manuel d'instruction fourni avec chaque kit de réactifs. Les capillaires ont été gardés sur glace jusqu'au moment de les mettre dans le *LightCycler*. Les conditions du PCR sont résumées dans le tableau 2.1. La pente de la courbe standard devait avoir une valeur située entre -3.3 et -3.8 pour être considérée valide. Lorsque la bonne courbe standard a été réalisée, un échantillon de chaque courbe standard pour chacun des gènes, correspondant à une des dilutions utilisées pour générer la courbe, a été aliquoté en plusieurs échantillons de 5 μ l afin d'être utilisés comme échantillons calibrateurs lors des réactions de quantification. Un calibrateur est un échantillon pour lequel l'expression du gène est stable et connue. Aussi, pour chaque réaction de PCR qui a été effectuée, il devait toujours y avoir un échantillon contrôle sans ARN (NTC : No template control), ainsi qu'un échantillon contrôle sans transcriptase inverse (RT-).

Par la suite, les réactions de quantification relative ont pu être réalisées à partir

de l'ARN total. La réaction a été effectuée dans des capillaires différents pour chaque échantillon d'ARN extrait aux différents temps p.i. et pour chaque gène testé, toujours en suivant le protocole du kit d'amorces et de sondes fourni par Qiagen, comme expliqué précédemment. Des duplicata ont été effectués pour chacun des échantillons. Les calculs mathématiques ont tous été faits par le logiciel de quantification relative du LightCycler de Roche. Malheureusement il est impossible d'obtenir la séquence des sondes et amorces utilisées dans le kit, car Qiagen ne donne pas cette information. Cependant, la séquence reconnue par les sondes et amorces est celle de NF- κ B murin; p50 (ou p105), car l'analyse de l'expression du gène de NF- κ B a été faite sur l'ARN des cellules L929.

Tableau 2.1
Conditions de PCR en temps réel en une étape du kit *QuantiTect Gene expression assays* de Qiagen utilisées avec le *LightCycler* de Roche

Étape	Temps	Température	Ramp
Transcription inverse	20 min	50°C	20°/sec
PCR			
Activation	15 min	95°C	20°C/sec
Dénaturation	0 sec	94°C	20°C/sec
Hybridation/détection	30 sec	56°C	20°C/sec
Élongation	30 sec	76°C	2°C/sec
Nombre de cycles	40-45		

Ramp : vitesse entre les changements de température

Min : minute

Sec : seconde

°C : degré Celcius

2.5 Extraction protéique

Suite aux infections avec les trois virus, des extractions protéiques ont été effectuées afin de visualiser I κ B α sous la forme phosphorylée ou non.

Après avoir enlevé complètement le milieu de culture, les cellules ont été décollées en raclant chaque tube sur la grille de la hotte et 300 μ l de tampon d'extraction RIPA (150 mM NaCl, 1% (v/v) NP-40, 0.5% (p/v) deoxycholate, 0.1% (p/v) SDS, 50 mM Tris-HCl et 1 mM PMSF frais, pH 8.0) ont été ajoutés à chacun. Les tubes ont été mis sur glace pendant 10 minutes et centrifugés pendant 10 minutes à 10,000 rpm (8000 x g) à 4°C. Les surnageants ont été récupérés et congelés à -20°C.

2.5.1 Dosage protéique

Le dosage protéique a été fait selon le kit *DC Protein assay* de BioRad en utilisant comme standard l'albumine sérique bovine (BSA) dissoute dans le tampon RIPA.

2.5.2 Précipitation protéique à l'acétone

Afin de pouvoir concentrer les extraits protéiques, une précipitation à l'acétone a été exécutée. Un volume correspondant à 200 μ g de protéines a été prélevé de chaque extrait protéique. À ce volume, 4 volumes d'acétone 100% à -20°C ont été ajoutés. Le mélange a été mis à -20°C durant 30 minutes. Par la suite, une centrifugation de 15 minutes à vitesse maximale (15,000 rpm) à 4°C a été effectuée. Le surnageant a été enlevé et les tubes ont été placés dans un *Speedvac* afin d'enlever l'excès d'acétone. Les culots ont été resuspendus dans 50 μ l de tampon RIPA. Un dosage protéique a suivi cette étape pour s'assurer de la concentration protéique après

la précipitation.

2.5.3 Analyse par immunobuvardage

Afin de caractériser la présence de la protéine I κ B α phosphorylée ou non dans les cellules infectées, un gel d'électrophorèse 12% de sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide (SDS/PAGE) dans lequel 40 μ g de protéines ont été migrées (selon le conseil d'un aide technique de la compagnie Cell Signaling Technology) suivi d'un immunobuvardage ont été réalisés. Suite au gel, un transfert de type Western des protéines sur une membrane en fluorure de polyvinylidène (PVDF) (Millipore) a été fait. Après, les membranes ont été lavées avec 25 millilitres de PBS 1X/0.1% Tween (PBS/T) pendant 5 minutes. Les membranes ont été incubées au nombre de quatre à la fois avec 25 ml de tampon de blocage (PBS 1X, 0.1% Tween-20 et 5% de lait en poudre) pendant 1 heure. Les membranes ont été lavées 3-4 fois à raison de 5 minutes à chaque fois avec du PBS/T. Une incubation d'une nuit («*overnight*» : O/N) à 4°C avec l'anticorps anti-I κ B α ou anti-phospho-I κ B α dilué (1/1000 ou 1/2000 respectivement) (Cell signaling Technology) dans 20 ml de tampon de blocage a suivi les premiers lavages. Après l'incubation avec le premier anticorps, d'autres lavages ont été effectués de la même manière. Les membranes ont été incubées pendant 1 heure à température pièce avec le deuxième anticorps qui est un anti-IgG de lapin (I κ B α) ou de souris (phospho-I κ B α) conjugué à la HRP (Horseradish peroxidase). Trois ou quatre derniers lavages ont été faits suite à cette incubation, avant de mettre les membranes en contact avec les réactifs de détection du kit (ECL plus Western blotting detection reagents, Amersham Biosciences). Finalement, la révélation et la photo ont été effectuées. Les bandes correspondant aux deux protéines sont celles à 41 kDa pour I κ B α et 40 kDa pour p-I κ B α . Les résultats ont été déterminés et quantifiés à l'aide d'un densitomètre.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

Le VSV sauvage inhibe la transcription de l'ADN en ARN_m et la traduction de cet ARN en protéine. Le virus exerce ces actions à l'aide de sa protéine M qui agit à différents niveaux dans la machinerie cellulaire. Il serait possible également que le VSV inhibe des étapes en amont du facteur de transcription TFIID en ce qui a trait à la transcription du gène de l'IFN- β . Par exemple, il pourrait inhiber NF- κ B, qui est un facteur essentiel à l'activation du gène de l'IFN- β . Il y aurait plusieurs possibilités pour le VSV de perturber l'action de NF- κ B, mais les deux principales sont lors de son expression et lors de sa libération par son inhibiteur cytoplasmique, I κ B- α . Afin de vérifier l'expression du gène de NF- κ B, une PCR en temps réel avec l'ARN total obtenu de cellules infectées a été effectuée. De plus, pour étudier la phosphorylation de la protéine inhibitrice I κ B- α , des analyses par immunobuvardage ont été réalisées sur les extraits protéiques obtenus suite à ces infections. Deux types cellulaires ont été infectés par les différents virus : les cellules HeLa, qui sont des cellules épithéliales humaines, et les cellules L929, étant des fibroblastes murins. Ces deux types cellulaires ne réagissent pas de la même manière à l'infection par le VSV (Kopecky et Lyles, 2003) et un des différents effets d'une infection par le VSV sur ces deux types cellulaires a déjà été étudiée par d'autre équipes (Ahmed *et al.* 2003, Boulares *et al.* 1996, Desforges *et al.* 2001).

3.1. Ratio de la concentration d'ARN total sur la concentration protéique totale.

Le rapport de la concentration d'ARN total ([ARN total]) sur la concentration protéique totale ([protéines totales]) a été fait afin de voir si les profils de transcription ou de traduction générales montraient des tendances différentes au cours de l'infection par les trois virus. Si le ratio diminue, c'est que la [ARN total] ou la transcription générale diminue. Il est aussi possible que se soit la [protéines totales] qui augmente ou que la traduction générale augmente pour expliquer une diminution du ratio. Comme mentionné précédemment, les heures de récolte post-infection (p.i.) sont 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 heures. Un point important à mentionner est que le temps «0 hre» correspond en fait à 45 minutes d'absorption du virus par les cellules. De plus, ces tests constituent des tests préliminaires, ce qui explique l'absence d'écart-type sur les graphiques et également l'absence de contrôles pour vérifier la quantité de protéines déposée sur les gels.

Suite au dosage d'ARN à 260 nm et des protéines à l'aide du kit de BioRad, les ratios [ARN]/[protéines] illustrés aux figures 3.1 et 3.2 ont été obtenus pour les cellules HeLa et L929 respectivement. Les trois virus modifient différemment le ratio.

Le virus TP6 est un virus qui provoque une diminution du ratio [ARN]/[protéines] au début de l'infection pour les deux types cellulaires et ce ratio reste relativement stable pendant 12 heures d'infection. Le ratio ne diminue pas en dessous de 0.4 même après 12 hres p.i.

Le virus sauvage HR a un effet distinct sur le ratio chez les deux types cellulaires. Les cellules HeLa (figure 3.1) non infectées présentent un ratio de la [ARN total]/[protéines totales] de 0.653. Il y a une augmentation du ratio à 0hre qui est alors de 0.913 et le ratio est stable jusqu'à 6hres p.i. À 8 hres p.i., une diminution

du ratio amène la valeur (ratio=0.631) à la même que celle des cellules non infectées. À 10 et 12 hres p.i. le ratio est de 0.329 et 0.349 respectivement. Les cellules L929 infectées par HR ne montrent pas la même réponse quand à leur ratio de la concentration d'ARN total sur la concentration protéique totale (figure 3.2). Les cellules L929 non infectées ont un ratio des concentrations de 0.638, comparable au ratio observé pour les cellules HeLa non infectées. Les valeurs du ratio sont entre 0.688 à 0.777 entre 0 et 10 hres p.i. Donc le ratio est relativement stable. À 12 hres s'ensuit une diminution du ratio à 0.530. Ici encore, le ratio ne diminue pas en dessous de cette valeur.

T1026 aussi entraîne une réponse différente sur les cellules HeLa et les cellules L929. Les cellules HeLa non infectées ont un ratio de 0.702 (figure 3.1). Le ratio augmente à 0 hre (45 minutes d'absorption) pour atteindre 0.910 et à 4 hres p.i. le ratio atteint 1.110. Par la suite il y a une diminution qui aboutit à environ 0.54 de ratio à 8 et 10 hres p.i. À 12 hres, il y a une élévation du ratio qui est alors de 0.969, semblable à celle obtenue à 0 hre. Les cellules L929 infectées par T1026 présentent un modèle de variation du ratio de la [ARN totale]/[protéines totales] différent (figure 3.2) montrant en général une augmentation du ratio au cours du temps par rapport au ratio obtenu chez les cellules non infectées. Les cellules non infectées ont un ratio de 0.789, qui est plus élevé que le ratio obtenu chez les cellules L929 non infectées lors de l'infection par HR (ratio=0.638). À 12hres post-infection, le ratio atteint la valeur de 1.037, qui est semblable à celui observé chez les cellules HeLa à 4 hres p.i.

Pour résumé, les ratios [ARN totale]/[protéines totales] sont différents lors de l'infection par les trois virus sur les deux types cellulaires. Le virus TP6 est le virus qui ne cause presque pas de variations sur les ratios en fonction du temps post infection et ce sur les cellules HeLa et L929. Le virus HR cause un effet différent sur les deux types de cellules. Les cellules L929 montrent un ratio plutôt stable dans le temps, tandis que les cellules HeLa ont un ratio qui ne varie presque pas les six

premières heures, mais qui diminue fortement à 8 hres et encore plus à 10 et 12 heures p.i. Le virus T1026 fait hautement varier le ratio au cours du temps dans les cellules L929 et aussi dans les cellules HeLa, mais à 12 hres p.i. dans les deux types cellulaires, le ratio est semblable.

3.2 Quantification relative du gène du NF- κ B chez les cellules L929.

L'expression du gène de NF- κ B a été étudiée en effectuant une quantification relative de l'ARN_m de la sous-unité p50 de NF- κ B obtenu à partir de cellules infectées par les trois virus. La quantification n'est pas réalisée de manière absolue car la quantité absolue d'ARN_m du gène de NF- κ B n'est pas connue et donc il faut rapporter le niveau d'expression ou la variation du niveau d'expression à celui d'un gène domestique choisi, c'est à dire un gène qui s'exprime à taux constant dans la cellule. Ce type de mesure est commun pour les ARNm ayant une faible expression puisque la quantification par rapport à un nombre de cellules est souvent impossible.

Cette technique exige l'élaboration d'une courbe standard (C.S.) pour l'expression du gène de référence (Hprt1) et une C.S. pour l'expression du gène cible (NF- κ B) illustrées aux figures A.1 et A.2 de l'appendice A respectivement. La pente de la C.S. de Hprt1 est de -3.556 ce qui représente une efficacité de PCR (E) de 1.91 (exemple de calcul, appendice B). La pente de la C.S. du NF- κ B est de -3.657 et E = 1.88. Les valeurs d'efficacité de PCR donnent une information importante. L'efficacité de PCR maximum possible est 2, qui signifie que chaque produit de PCR est répliqué à chaque cycle. La valeur minimum possible est 1 correspondant à aucune amplification. Plus la valeur obtenue est près de 2 et plus la réaction de PCR est acceptable. Une fois que les courbes standard ont été approuvées, les PCR en temps réel ont été effectuées. Les figures A.3 et A.4 de l'appendice A montrent les

résultats bruts obtenus pour le virus HR et TP6 pour le gène *Hprt1* et les figures A.5 et A.6 de l'appendice A représentent les résultats bruts obtenus pour le gène *NF-κB*. Suite aux analyses effectuées à l'aide du logiciel de quantification relative du *LightCycler* de Roche, la figure 3.3 a pu être effectuée.

L'expression de l'ARN de *NF-κB* est différente lors de l'infection des cellules L929 par les virus HR et TP6. En effet, HR amène une diminution progressive de l'expression du gène du *NF-κB* entre 0 et 6 hres p.i. jusqu'à atteindre à 6 heures la moitié de l'expression obtenue chez les cellules non infectées (ratio=0.53). À 8 hres p.i., il y a une forte augmentation (ratio=1.27), suivie d'une diminution graduelle qui à 12 hres p.i. atteint une ratio de 0.84, presque le même ratio qu'à 0 hre (45 minutes) soit 0.81.

Le virus TP6 produit un autre patron d'expression du gène du *NF-κB*. En fait, il serait possible de dire que la quantité relative d'ARN de *NF-κB* augmente progressivement au cours du temps. À 4 hres p.i. il y a une diminution du ratio qui atteint 0.78 qui ne fausse pas cette tendance. L'augmentation graduelle aboutit à un ratio de 1.71 à 12hres p.i.

Sommairement, le virus HR diminue l'expression du *NF-κB* durant les six premières heures post-infection. Par la suite, il y a une augmentation à 8hres p.i. et finalement une diminution à 12 hres p.i. Le virus T1026 provoque une augmentation de l'expression du gène de *NF-κB* au cours des heures post-infection jusqu'à doubler le ratio par rapport au cellules non infectées.

3.3 Analyse de la protéine inhibitrice kappa B (I κ B) sous ses formes non phosphorylée et phosphorylée.

La principale protéine inhibitrice de NF- κ B, I κ B α , accomplit son action en se liant à NF- κ B l'empêchant ainsi de pénétrer dans le noyau et d'activer la transcription des gènes cibles. Afin de le libérer, I κ B α doit être phosphorylé par le complexe IKK et par la suite il doit être ubiquitiné et envoyé au protéasome pour y être dégradé. Afin de visualiser l'effet de l'infection par le VSV sur la présence des deux formes de la protéine, soit I κ B α -phosphorylé ou non, dans les cellules HeLa et L929 infectées, des analyses par immunobuvardage ont été effectuées.

Les figures 3.4 à 3.15 montrent les résultats bruts obtenus suite aux immunobuvardages pour la protéine I κ B α phosphorylée ou non dans les cellules HeLa et L929 infectées par les virus VSV HR, VSV TP6 et VSV T1026. Les immunobuvardages ont été analysés à l'aide d'un densitomètre afin d'obtenir des données qui ont permis de réaliser les graphiques des figures 3.4 à 3.15.

Le virus HR diminue drastiquement l'expression de la protéine I κ B α non phosphorylée (figure 3.4) ou phosphorylée (p-I κ B α) (figure 3.10) dans les cellules HeLa à 0 hre p.i. Cette diminution est maintenue tout au long de l'infection. De plus, il y a moins de protéine p-I κ B α que de protéine normale. Dans les cellules L929 (figure 3.7 et figure 3.13), HR a un effet moins drastique à 0 hre p.i. En fait, pour la protéine phosphorylée (figure 3.13), il y a une augmentation de son expression (116.8%). Par la suite, celle-ci diminue et à 6 hres p.i. il n'y a plus d'expression de la protéine. Tandis que pour la protéine I κ B α normale (figure 3.7), entre 2 et 10 hres p.i., les pourcentages se situent entre 21.5% et 35.8%. À 12 hres p.i., l'expression tombe à 7%.

Le mutant T1026 du VSV change l'expression de la protéine I κ B α normale (figure 3.5) dans les cellules HeLa. À 0hre p.i. il y a une légère augmentation à 113.4% et par la suite elle diminue jusqu'à 52.1% à 6 hres p.i. Entre 8 et 12 hres p.i. l'expression de I κ B α augmente lentement de 67.6% à 74.2%. La protéine p-I κ B α est exprimée de manière plus étonnante dans les cellules HeLa infectées par T1026 (figure 3.11). À 0 hre p.i., il y a une petite baisse de l'expression à 80.9%. À 2 hres p.i., l'expression de p-I κ B α augmente à 279.8% et diminue lentement jusqu'à 6hres pour atteindre 68.6%. Entre 8 et 12 hres p.i., l'expression de p-I κ B α augmente pour culminer à 12 hres p.i. à 339% d'expression par rapport à celle des cellules non infectées. Ensuite, l'expression de la protéine I κ B α ou de la protéine p-I κ B α dans les cellules L929 infectées par T1026 est différente. L'expression de la protéine I κ B α subit une diminution à 43.1% à 0 hre p.i. (figure 3.8). Par la suite, le niveau d'expression est maintenu relativement stable jusqu'à 6 hres p.i. À 8 hres p.i., il y a une augmentation de l'expression à 81.3% et elle diminue pendant les dernières heures p.i. pour atteindre 67.8% à 12 hres p.i. L'expression de la protéine p-I κ B α (figure 3.14) diminue à 0 hre p.i. et son expression y est de 25.2%. Elle s'accroît à 84.4% à 2 hres p.i. et s'élève lentement jusqu'à aboutir à 133.3% à 10 hres p.i. Elle s'affaiblie à 70.9% à 12 hres p.i.

Finalement, le virus TP6 diminue l'expression de la protéine I κ B α dans les cellules HeLa à 73.2% à 0 hre p.i. et cette diminution continue jusqu'à 12 hres p.i. où elle est de 40.4% (figure 3.6). Ce niveau d'expression est maintenu entre 6 et 12 hres p.i. L'expression de la protéine p-I κ B α exprimée dans les cellules HeLa infectées par TP6 (figure 3.12) diminue entre 0 et 12 hres p.i. La diminution la plus notable survient à 2 hres p.i. L'infection par TP6 des cellules L929 amène un tout autre effet sur l'expression des protéines I κ B α et p-I κ B α (figure 3.9 et 3.15 respectivement). L'expression de I κ B α augmente à 0 et 2 hres p.i. (133.9% et 154.4%) et redescend à 86% à 4 hres et 6 hres p.i. Elle diminue encore jusqu'à 75% à 12 hres p.i. L'expression de p-I κ B α monte à 170.3% à 0 hres et diminue drastiquement à 60.5% à

2 hres. Par la suite il y a une diminution à 17.5% à 4 hres et finalement l'expression diminue progressivement jusqu'à 12% à 12 hres.

En général, il est possible de dire que le virus HR amène une diminution de la présence des deux protéines dans les cellules infectées. Le virus T1026 quant à lui, semble causer un effet réduit sur l'expression des protéines comparativement au virus sauvage. Enfin, le virus TP6 entraîne des effets plus remarquables sur l'expression des deux formes de la protéine $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, mais semble être moins agressif que le virus HR par rapport à la présence de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$.

Tableau 3.1

Tableau récapitulatif de la présence de la protéine $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ dans les extraits protéiques de cellules HeLa et L929 infectées par les virus VSV HR, T1026 ou TP6

	HR		T1026		TP6	
	$\text{I}\kappa\text{B}\alpha$	p- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$	$\text{I}\kappa\text{B}\alpha$	p- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$	$\text{I}\kappa\text{B}\alpha$	p- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$
HeLa	+/-	+/-	+++	-/+++	++/-	+/-
L929	++/-	++/-	++	++/-	+++	++/-

+ : Présence

- : absence

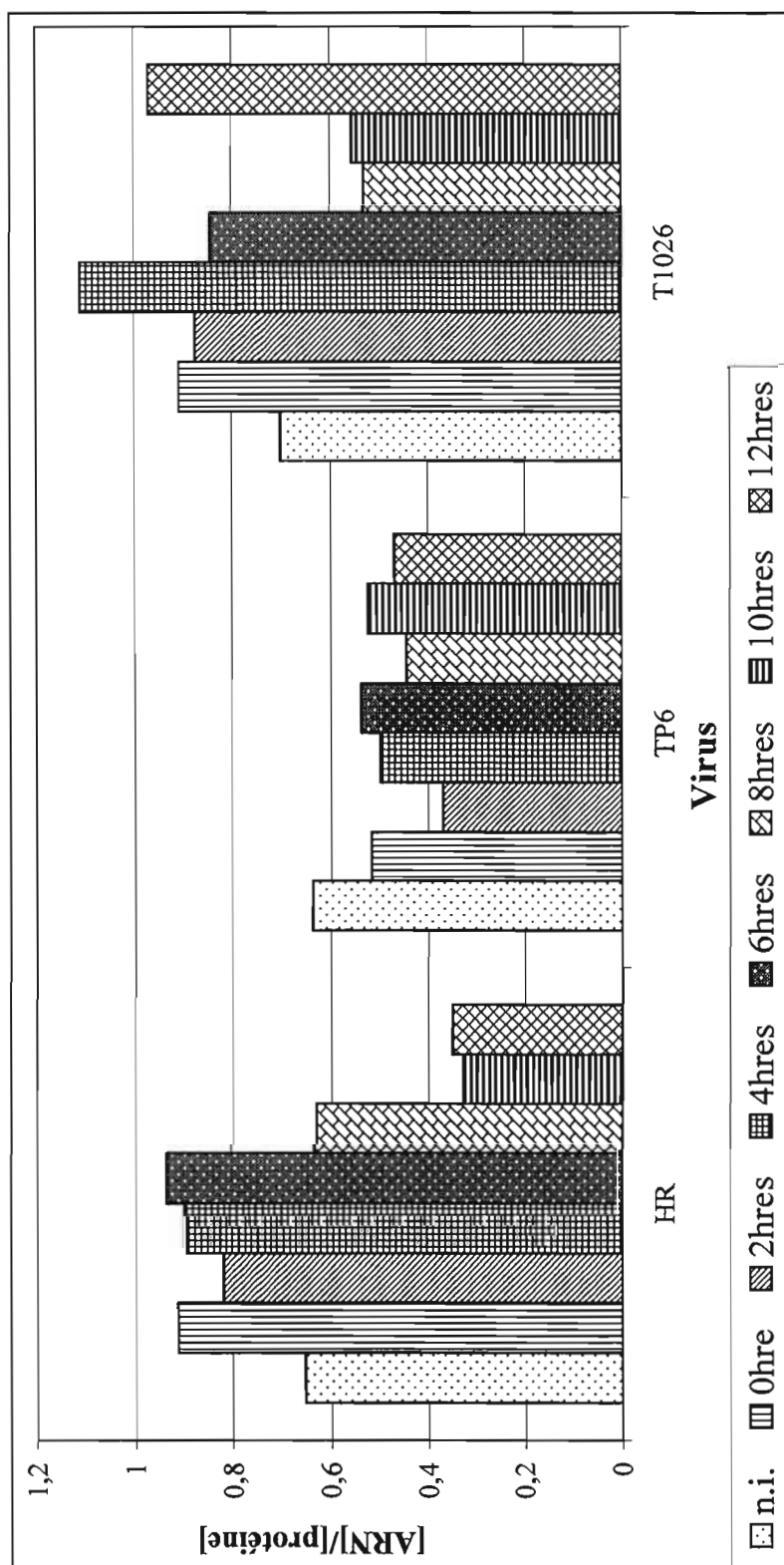


Figure 3.1. Ratio de la concentration d'ARN ($\mu\text{g/ml}$) sur la concentration de protéines ($\mu\text{g/ml}$) à différentes heures (hres) post-infection des cellules HeLa par les virus HR, TP6 et T1026. Les infections ont été faites à une multiplicité de 10 pfu/cellule.

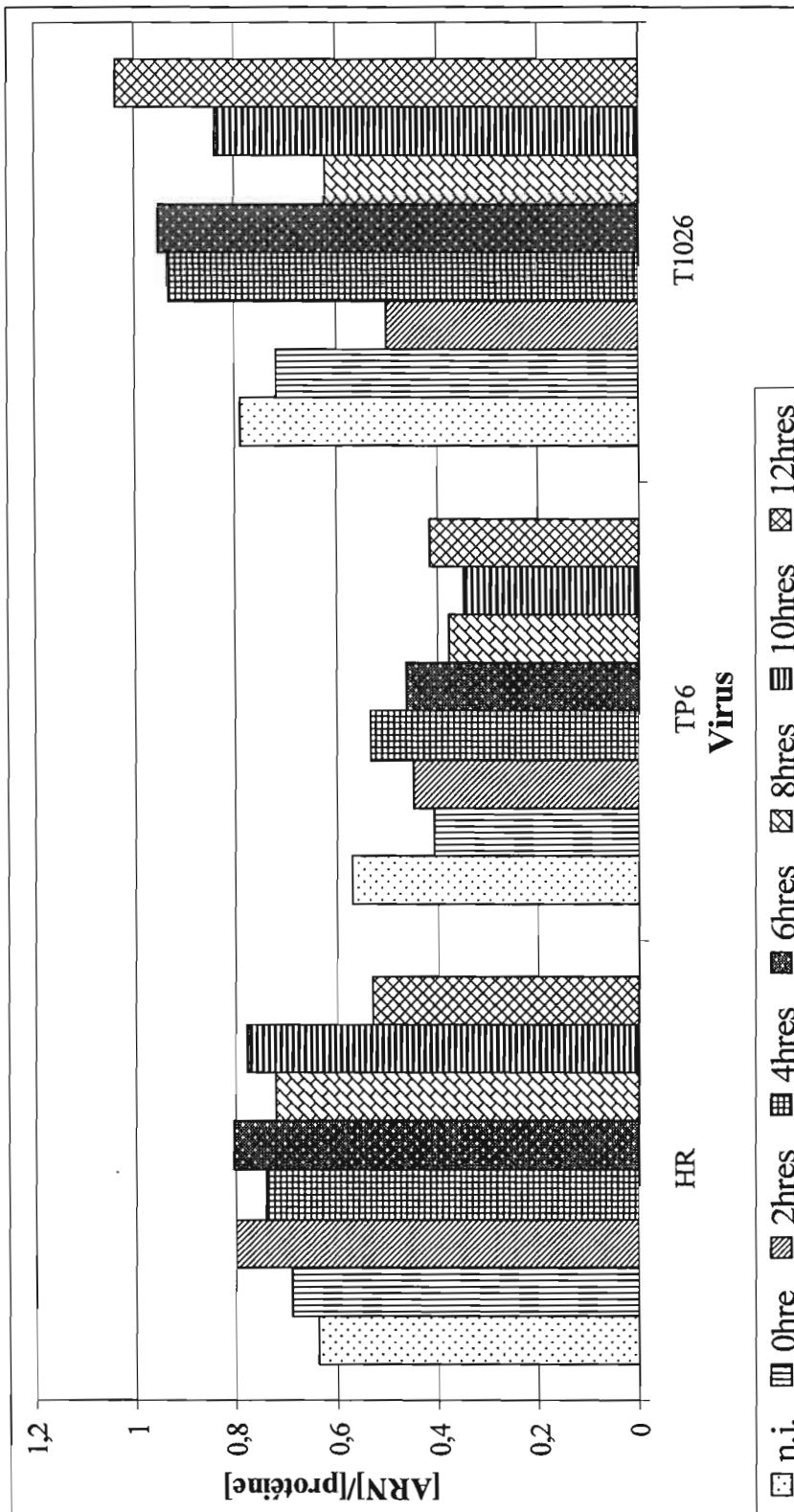


Figure 3.2. Ratio de la concentration d'ARN ($\mu\text{g/ml}$) sur la concentration de protéines ($\mu\text{g/ml}$) à différentes heures (hres) post-infection des cellules L929 par les virus HR, TP6 et T1026. Les infections ont été faites à une multiplicité de 10 pfu/cellule.

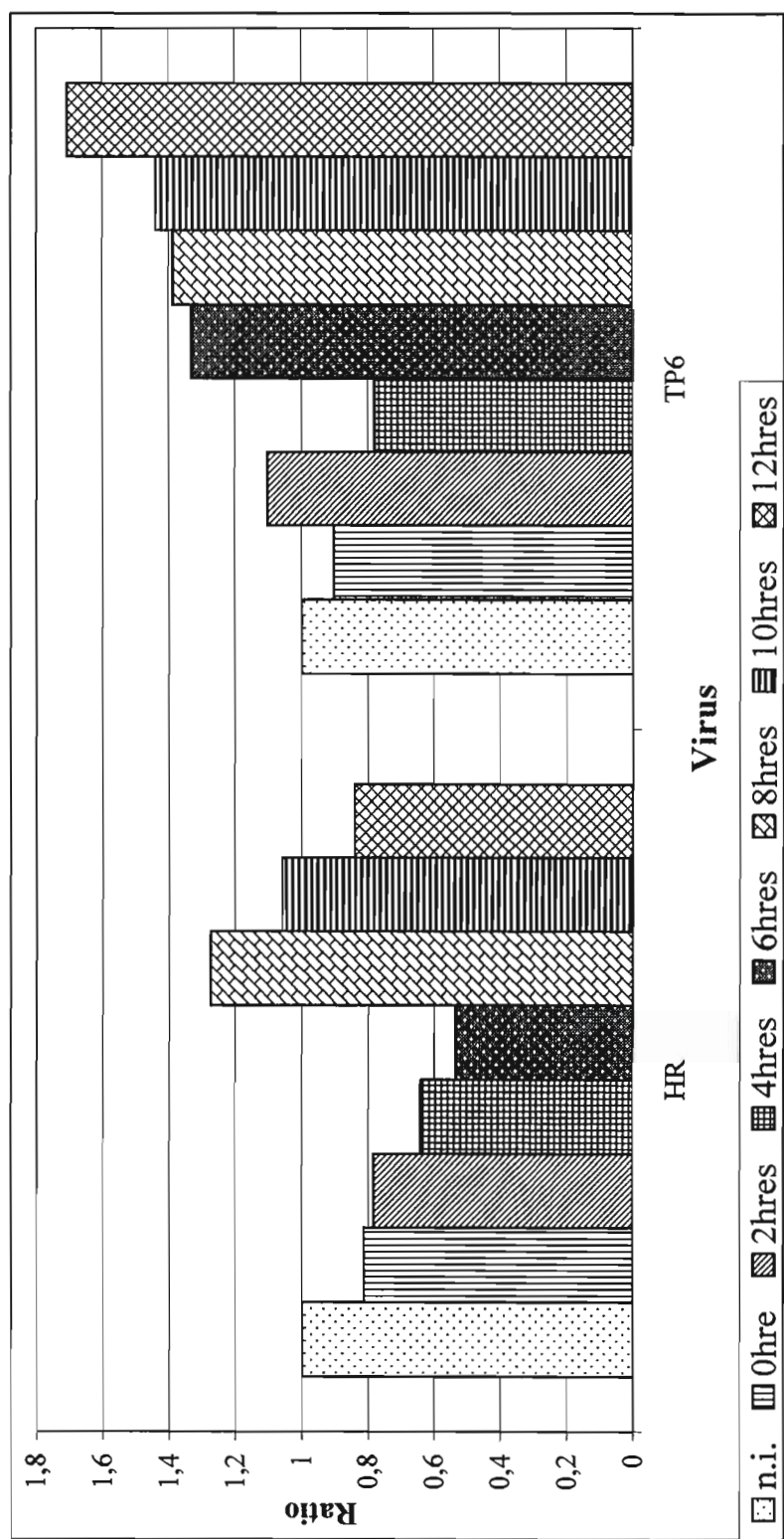


Figure 3.3. Expression du gène du NF- κ B analysée par PCR en temps réel dans les cellules L929 infectées par HR et TP6. Les cellules ont été infectées à une multiplicité de 10 pfu/cellule. Elles ont été récoltées à diverses heures (hres) post-infection (p.i.) et l'ARN a été extrait. Une RT-PCR et une PCR en temps réel ont été réalisées en une étape dans l'appareil de *Roche Inc.* Les ratios de chaque temps p.i. ont été calculés par rapport à la valeur obtenue pour les cellules non infectées (n.i.).

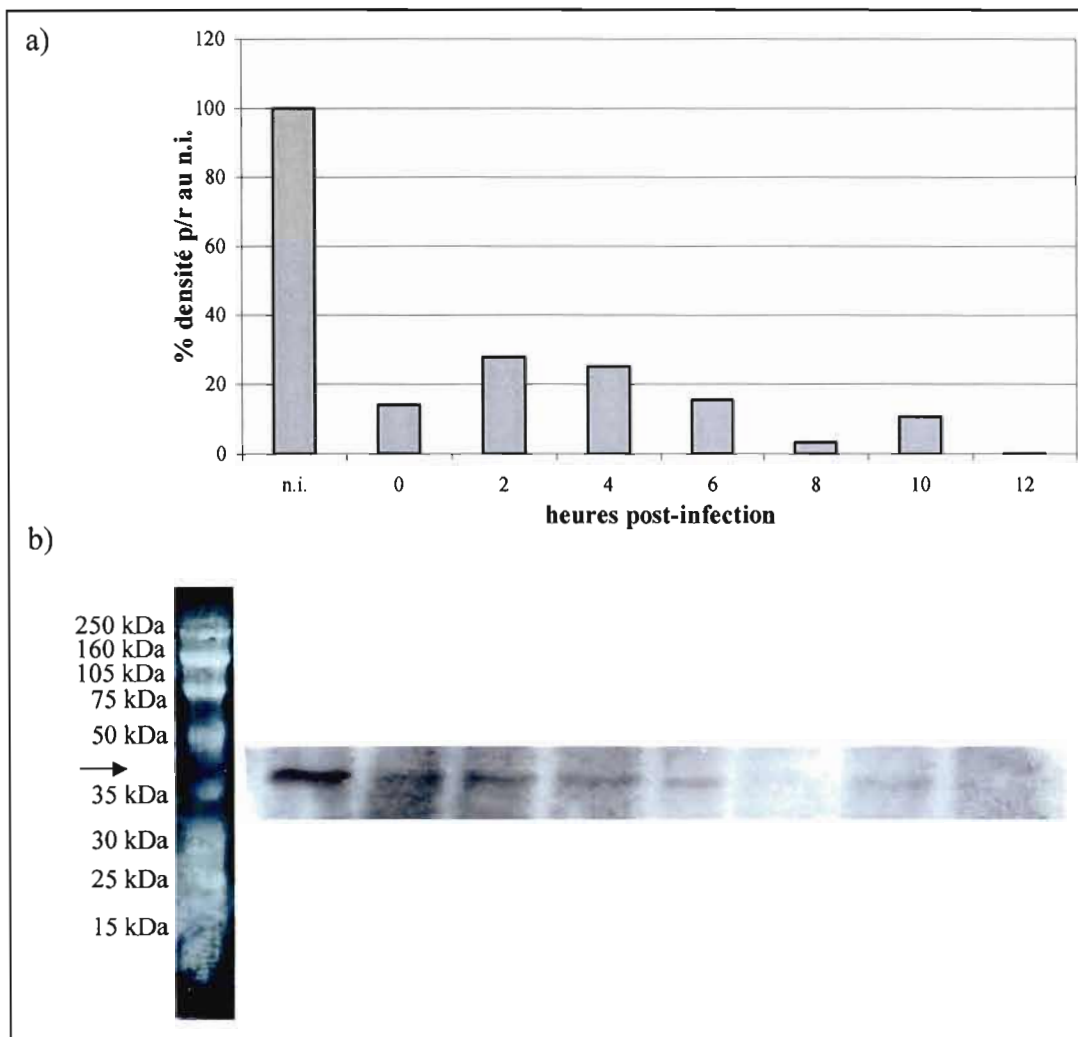


Figure 3.4. Expression de la protéine I κ B α à différentes heures (hres) post-infection (p.i.) dans les cellules HeLa infectées à une multiplicité de 10 pfu/cellule par le virus HR. a) La densité des bandes a été quantifiée avec un densitomètre. Les pourcentages obtenus ont été calculés par rapport à la valeur de densité obtenue pour les cellules non infectées (n.i.). b) Une quantité de 40 μ g de protéines totales a été migrée sur un gel d'électrophorèse SDS-PAGE 12% et un transfert par Western a été effectué sur une membrane en fluorure de polyvinylidène (PVDF) (Millipore). L'anticorps anti-I κ B α (Cell signaling Technology) a été dilué à 1/1000 et la réaction a été révélée avec un deuxième anticorps anti-IgG de lapin conjugué à la HRP (Horseradish peroxidase) (ECL plus Western blotting detection reagents, Amersham Biosciences).

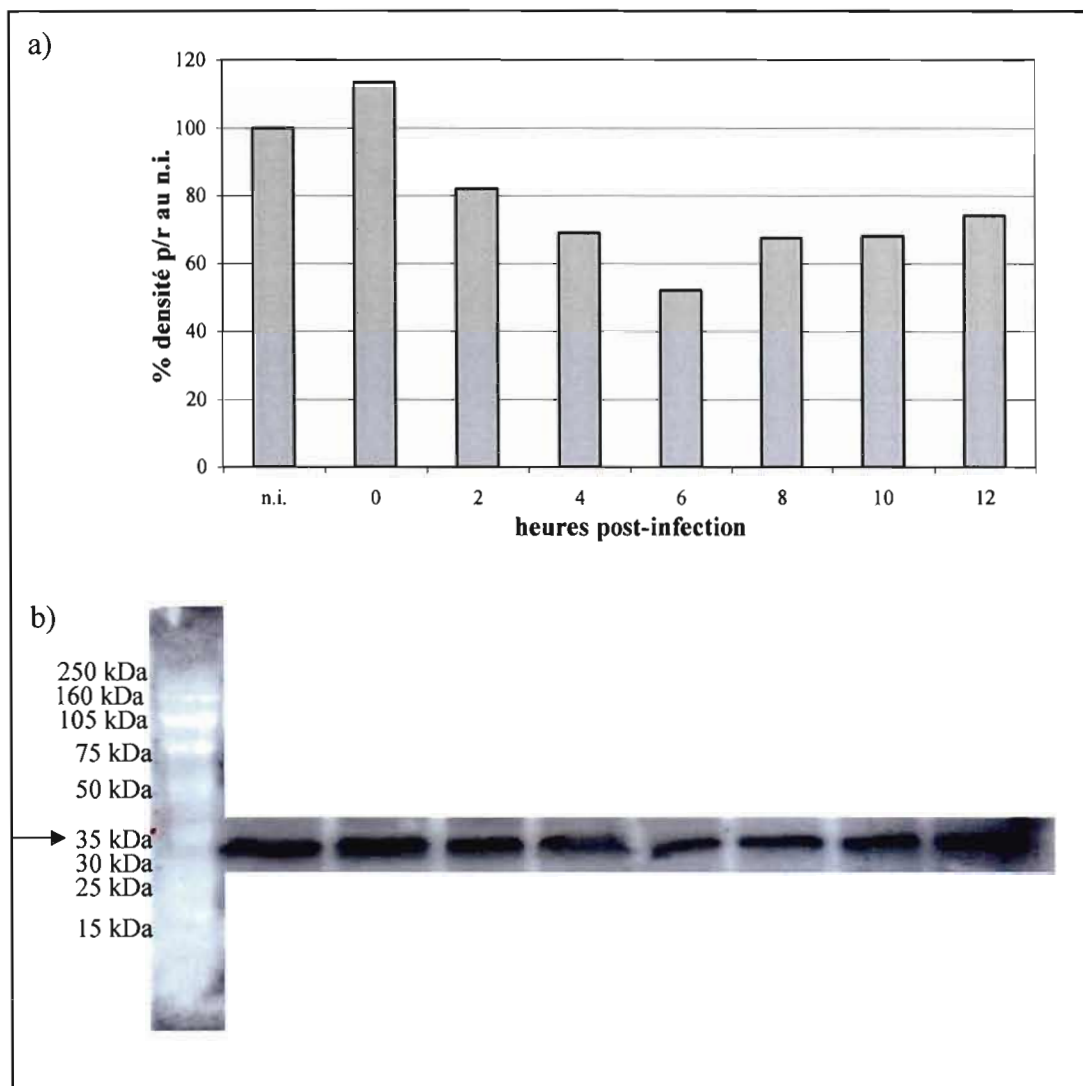


Figure 3.5. Expression de la protéine I κ B α à différentes heures (hres) post-infection (p.i.) dans les cellules HeLa infectées à une multiplicité de 10 pfu/cellule par le virus T1026. a) La densité des bandes a été quantifiée avec un densitomètre. Les pourcentages obtenus ont été calculés par rapport à la valeur de densité obtenue pour les cellules non infectées (n.i.). b) Une quantité de 40 μ g de protéines totales a été migrée sur un gel d'électrophorèse SDS-PAGE 12% et un transfert par Western a été effectué sur une membrane en fluorure de polyvinylidène (PVDF) (Millipore). L'anticorps anti-I κ B α (Cell signaling Technology) a été dilué à 1/1000 et la réaction a été révélée avec un deuxième anticorps anti-IgG de lapin conjugué à la HRP (Horseradish peroxidase) (ECL plus Western blotting detection reagents, Amersham Biosciences).

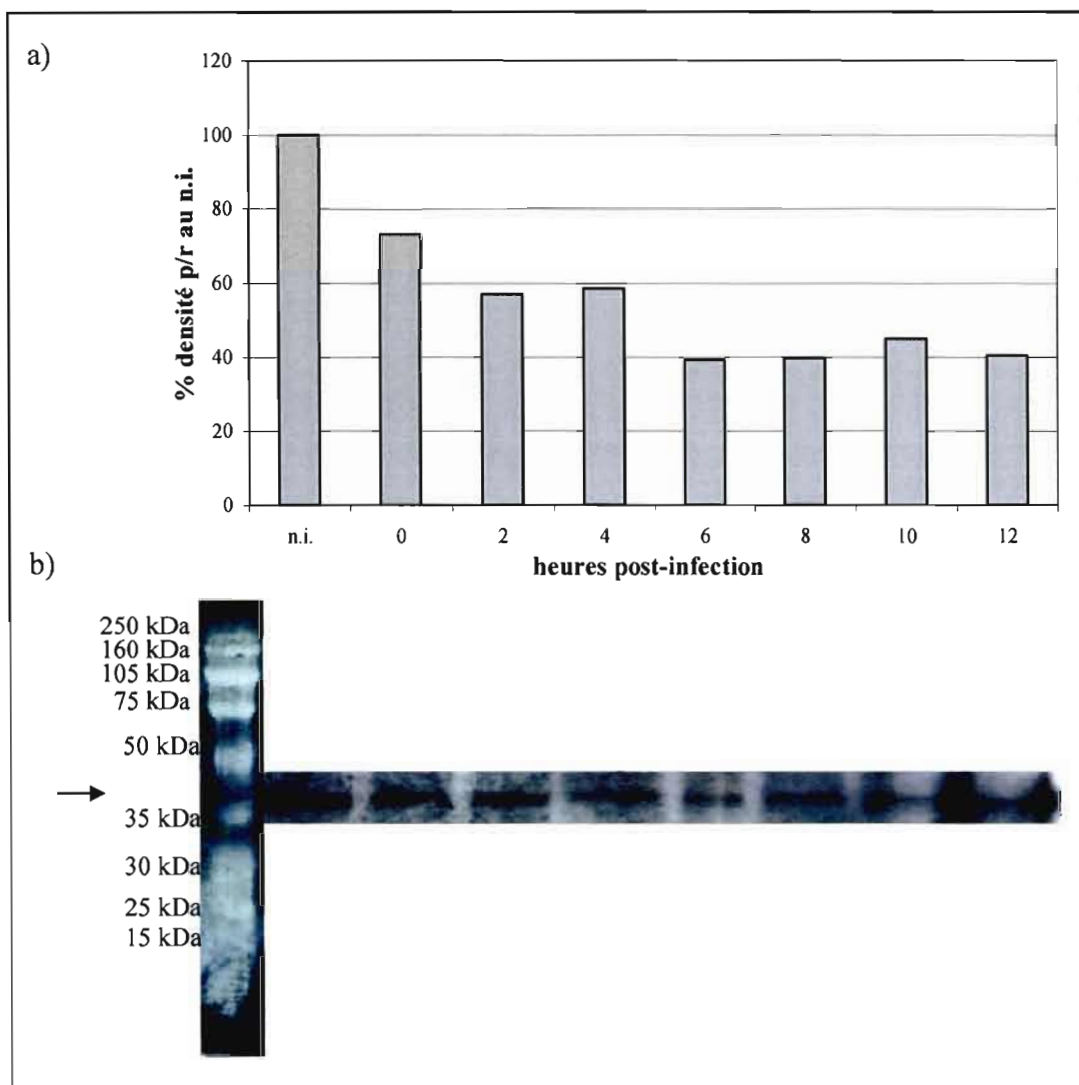


Figure 3.6. Expression de la protéine IκBα à différentes heures (hres) post-infection (p.i.) dans les cellules HeLa infectées à une multiplicité de 10 pfu/cellule par le virus TP6. a) La densité des bandes a été quantifiée avec un densitomètre. Les pourcentages obtenus ont été calculés par rapport à la valeur de densité obtenue pour les cellules non infectées (n.i.). b) Une quantité de 40 µg de protéines totales a été migrée sur un gel d'électrophorèse SDS-PAGE 12% et un transfert par Western a été effectué sur une membrane en fluorure de polyvinylidène (PVDF) (Millipore). L'anticorps anti-IκBα (Cell signaling Technology) a été dilué à 1/1000 et la réaction a été révélée avec un deuxième anticorps anti-IgG de lapin conjugué à la HRP (Horseradish peroxidase) (ECL plus Western blotting detection reagents, Amersham Biosciences).

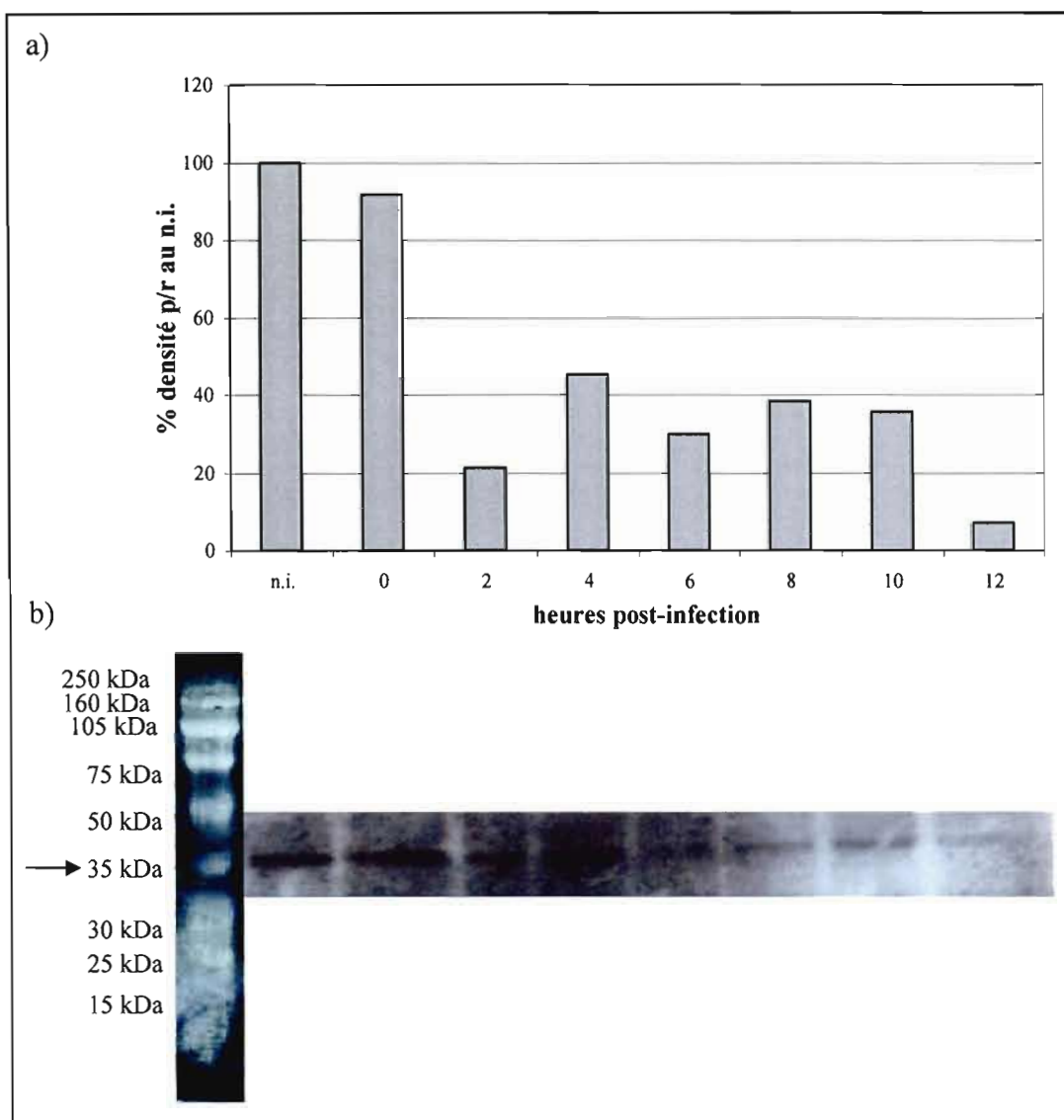


Figure 3.7. Expression de la protéine I κ B α à différentes heures (hres) post-infection (p.i.) dans les cellules L929 infectées à une multiplicité de 10 pfu/cellule par le virus HR. a) La densité des bandes a été quantifiée avec un densitomètre. Les pourcentages obtenus ont été calculés par rapport à la valeur de densité obtenue pour les cellules non infectées (n.i.). b) Une quantité de 40 μ g de protéines totales a été migrée sur un gel d'électrophorèse SDS-PAGE 12% et un transfert par Western a été effectué sur une membrane en fluorure de polyvinylidène (PVDF) (Millipore). L'anticorps anti-I κ B α (Cell signaling Technology) a été dilué à 1/1000 et la réaction a été révélée avec un deuxième anticorps anti-IgG de lapin conjugué à la HRP (Horseradish peroxidase) (ECL plus Western blotting detection reagents, Amersham Biosciences).

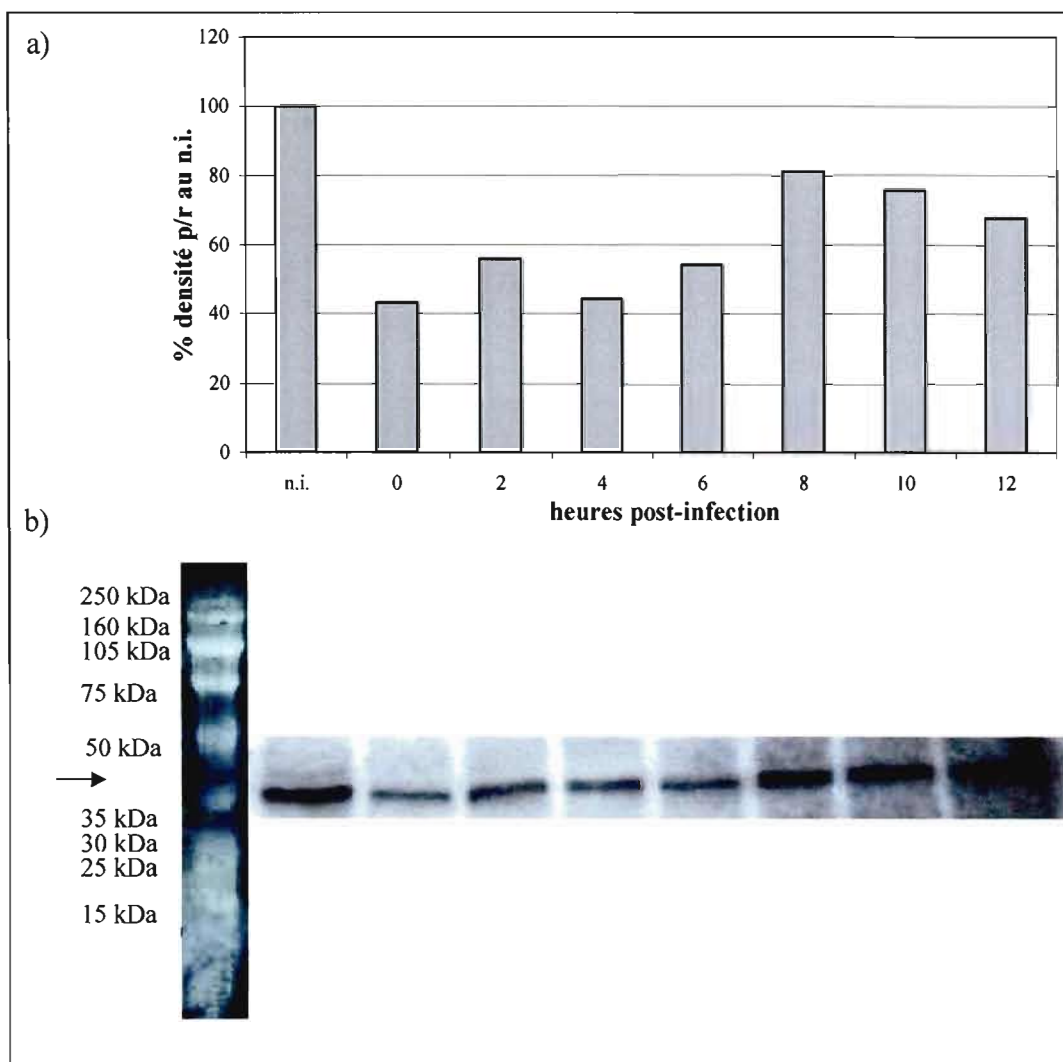


Figure 3.8. Expression de la protéine I κ B α à différentes heures (hres) post-infection (p.i.) dans les cellules L929 infectées à une multiplicité de 10 pfu/cellule par le virus T1026. a) La densité des bandes a été quantifiée avec un densitomètre. Les pourcentages obtenus ont été calculés par rapport à la valeur de densité obtenue pour les cellules non infectées (n.i.). b) Une quantité de 40 μ g de protéines totales a été migrée sur un gel d'électrophorèse SDS-PAGE 12% et un transfert par Western a été effectué sur une membrane en fluorure de polyvinylidène (PVDF) (Millipore). L'anticorps anti-I κ B α (Cell signaling Technology) a été dilué à 1/1000 et la réaction a été révélée avec un deuxième anticorps anti-IgG de lapin conjugué à la HRP (Horseradish peroxidase) (ECL plus Western blotting detection reagents, Amersham Biosciences).

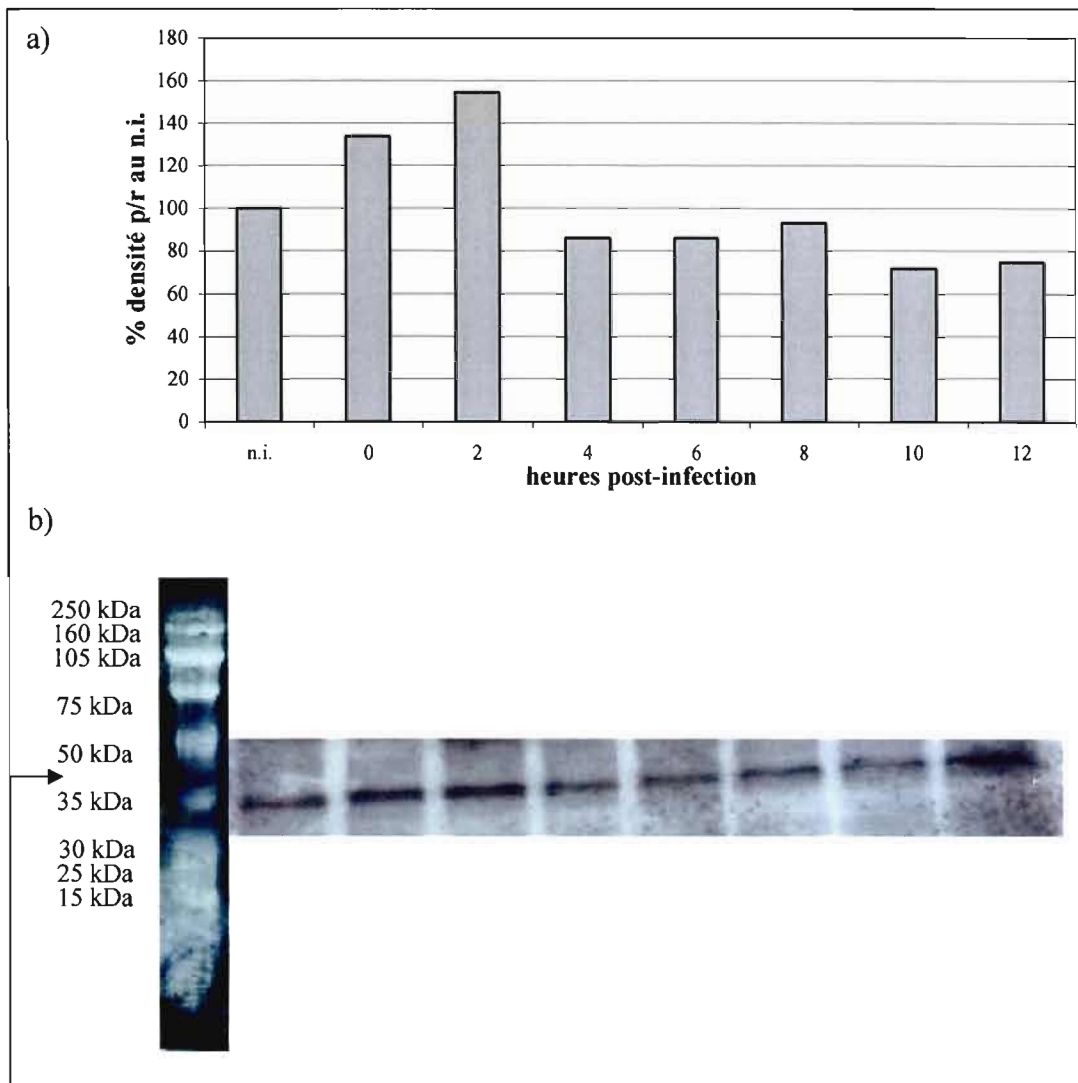


Figure 3.9. Expression de la protéine I κ B α à différentes heures (hres) post-infection (p.i.) dans les cellules L929 infectées à une multiplicité de 10 pfu/cellule par le virus TP6. a) La densité des bandes a été quantifiée avec un densitomètre. Les pourcentages obtenus ont été calculés par rapport à la valeur de densité obtenue pour les cellules non infectées (n.i.). b) Une quantité de 40 μ g de protéines totales a été migrée sur un gel d'électrophorèse SDS-PAGE 12% et un transfert par Western a été effectué sur une membrane en fluorure de polyvinylidène (PVDF) (Millipore). L'anticorps anti-I κ B α (Cell signaling Technology) a été dilué à 1/1000 et la réaction a été révélée avec un deuxième anticorps anti-IgG de lapin conjugué à la HRP (Horseradish peroxidase) (ECL plus Western blotting detection reagents, Amersham Biosciences).

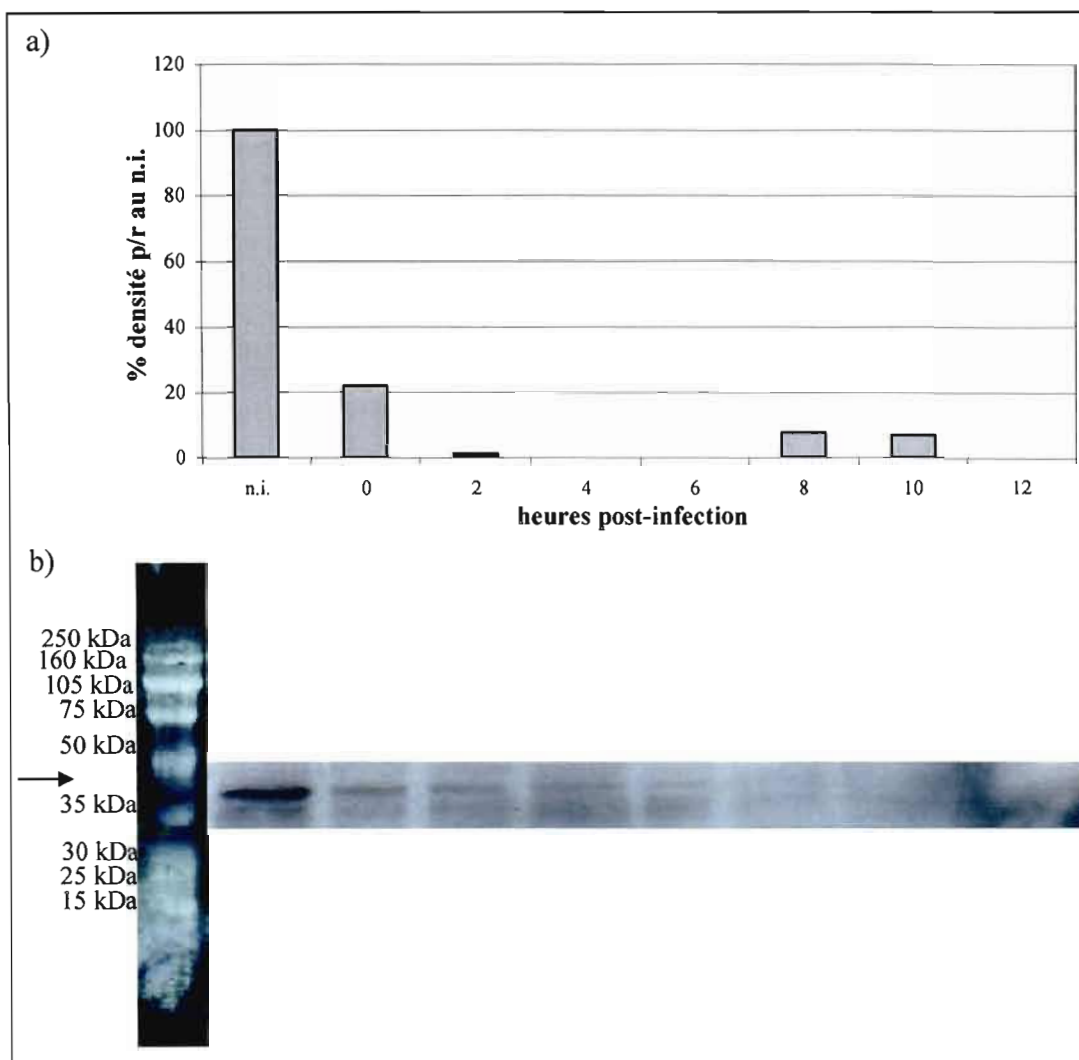


Figure 3.10. Expression de la protéine p-I κ B α à différentes heures (hres) post-infection (p.i.) dans les cellules HeLa infectées à une multiplicité de 10 pfu/cellule par le virus HR. a) La densité des bandes a été quantifiée avec un densitomètre. Les pourcentages obtenus ont été calculés par rapport à la valeur de densité obtenue pour les cellules non infectées (n.i.). b) Une quantité de 40 μ g de protéines totales a été migrée sur un gel d'électrophorèse SDS-PAGE 12% et un transfert par Western a été effectué sur une membrane en fluorure de polyvinylidène (PVDF) (Millipore). L'anticorps anti-p-I κ B α (Cell signaling Technology) a été dilué à 1/2000 et la réaction a été révélée avec un deuxième anticorps anti-IgG de lapin conjugué à la HRP (Horseradish peroxidase) (ECL plus Western blotting detection reagents, Amersham Biosciences).

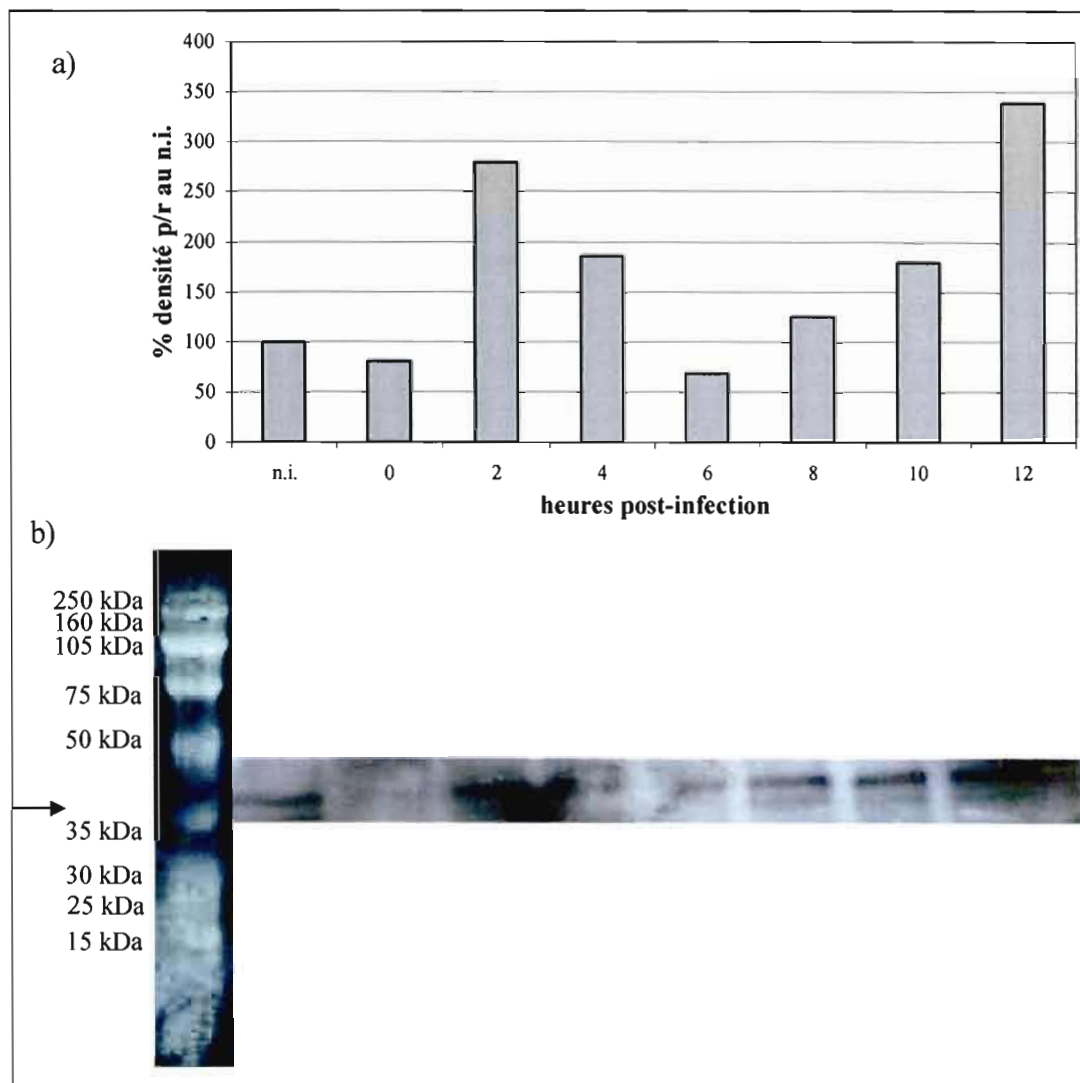


Figure 3.11. Expression de la protéine p-IκBα à différentes heures (hres) post-infection (p.i.) dans les cellules HeLa infectées à une multiplicité de 10 pfu/cellule par le virus T1026. a) La densité des bandes a été quantifiée avec un densitomètre. Les pourcentages obtenus ont été calculés par rapport à la valeur de densité obtenue pour les cellules non infectées (n.i.). b) Une quantité de 40 µg de protéines totales a été migrée sur un gel d'électrophorèse SDS-PAGE 12% et un transfert par Western a été effectué sur une membrane en fluorure de polyvinylidène (PVDF) (Millipore). L'anticorps anti-p-IκBα (Cell signaling Technology) a été dilué à 1/2000 et la réaction a été révélée avec un deuxième anticorps anti-IgG de lapin conjugué à la HRP (Horseradish peroxidase) (ECL plus Western blotting detection reagents, Amersham Biosciences).

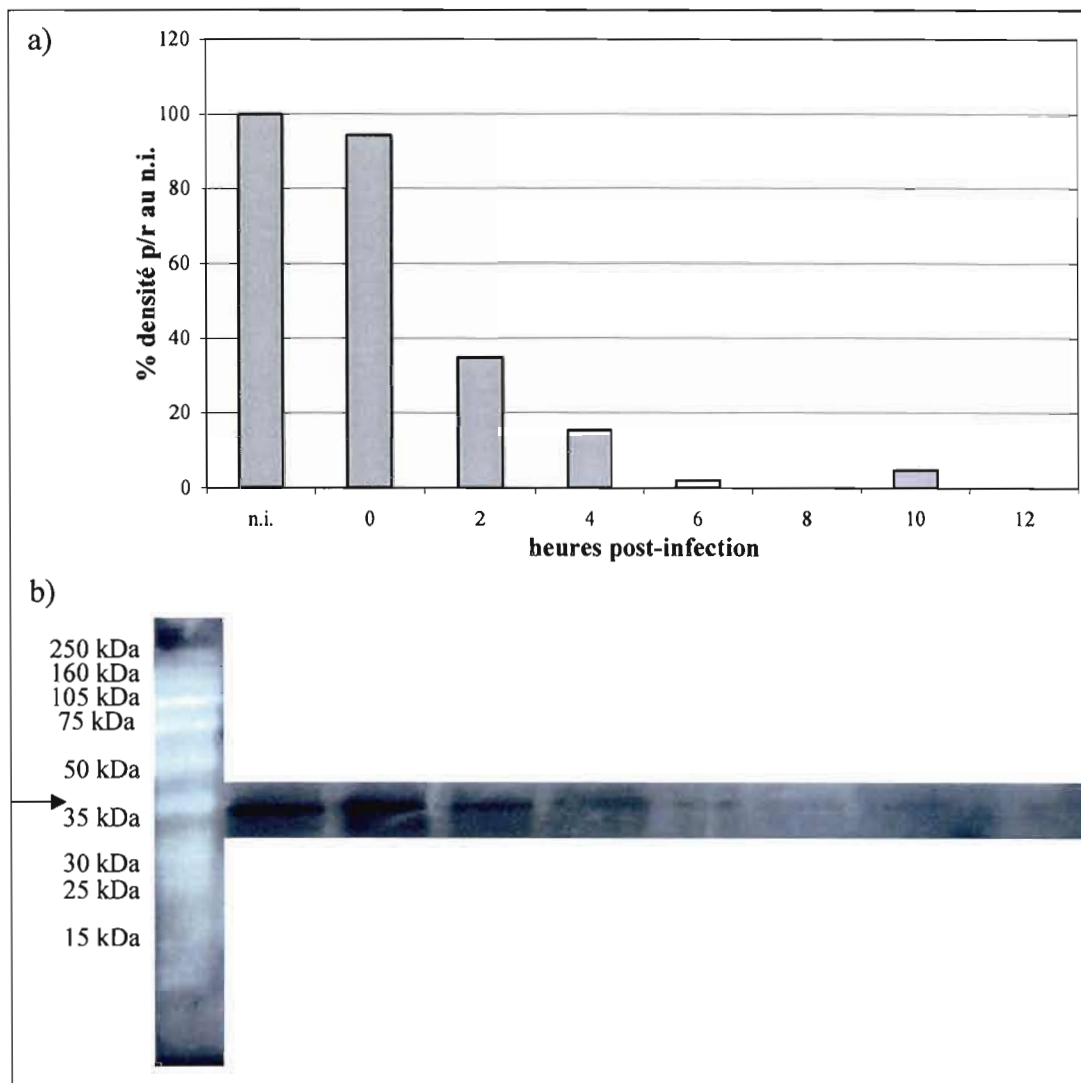


Figure 3.12. Expression de la protéine p-IκBα à différentes heures (hres) post-infection (p.i.) dans les cellules HeLa infectées à une multiplicité de 10 pfu/cellule par le virus TP6. a) La densité des bandes a été quantifiée avec un densitomètre. Les pourcentages obtenus ont été calculés par rapport à la valeur de densité obtenue pour les cellules non infectées (n.i.). b) Une quantité de 40 µg de protéines totales a été migrée sur un gel d'électrophorèse SDS-PAGE 12% et un transfert par Western a été effectué sur une membrane en fluorure de polyvinylidène (PVDF) (Millipore). L'anticorps anti-p-IκBα (Cell signaling Technology) a été dilué à 1/2000 et la réaction a été révélée avec un deuxième anticorps anti-IgG de lapin conjugué à la HRP (Horseradish peroxidase) (ECL plus Western blotting detection reagents, Amersham Biosciences).

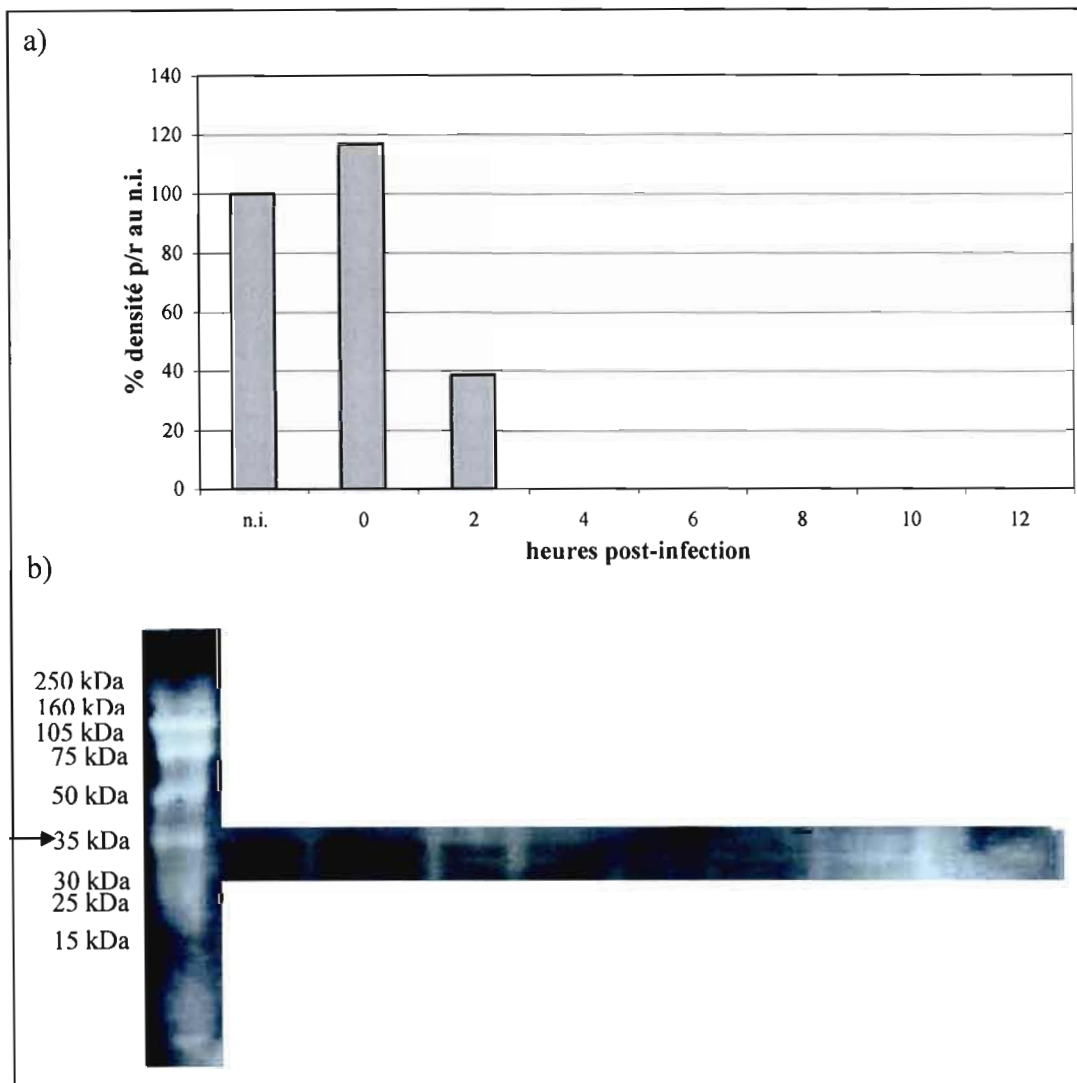


Figure 3.13. Expression de la protéine p-IκBα à différentes heures (hres) post-infection (p.i.) dans les cellules L929 infectées à une multiplicité de 10 pfu/cellule par le virus HR. a) La densité des bandes a été quantifiée avec un densitomètre. Les pourcentages obtenus ont été calculés par rapport à la valeur de densité obtenue pour les cellules non infectées (n.i.). b) Une quantité de 40 µg de protéines totales a été migrée sur un gel d'électrophorèse SDS-PAGE 12% et un transfert par Western a été effectué sur une membrane en fluorure de polyvinylidène (PVDF) (Millipore). L'anticorps anti-p-IκBα (Cell signaling Technology) a été dilué à 1/2000 et la réaction a été révélée avec un deuxième anticorps anti-IgG de lapin conjugué à la HRP (Horseradish peroxidase) (ECL plus Western blotting detection reagents, Amersham Biosciences).

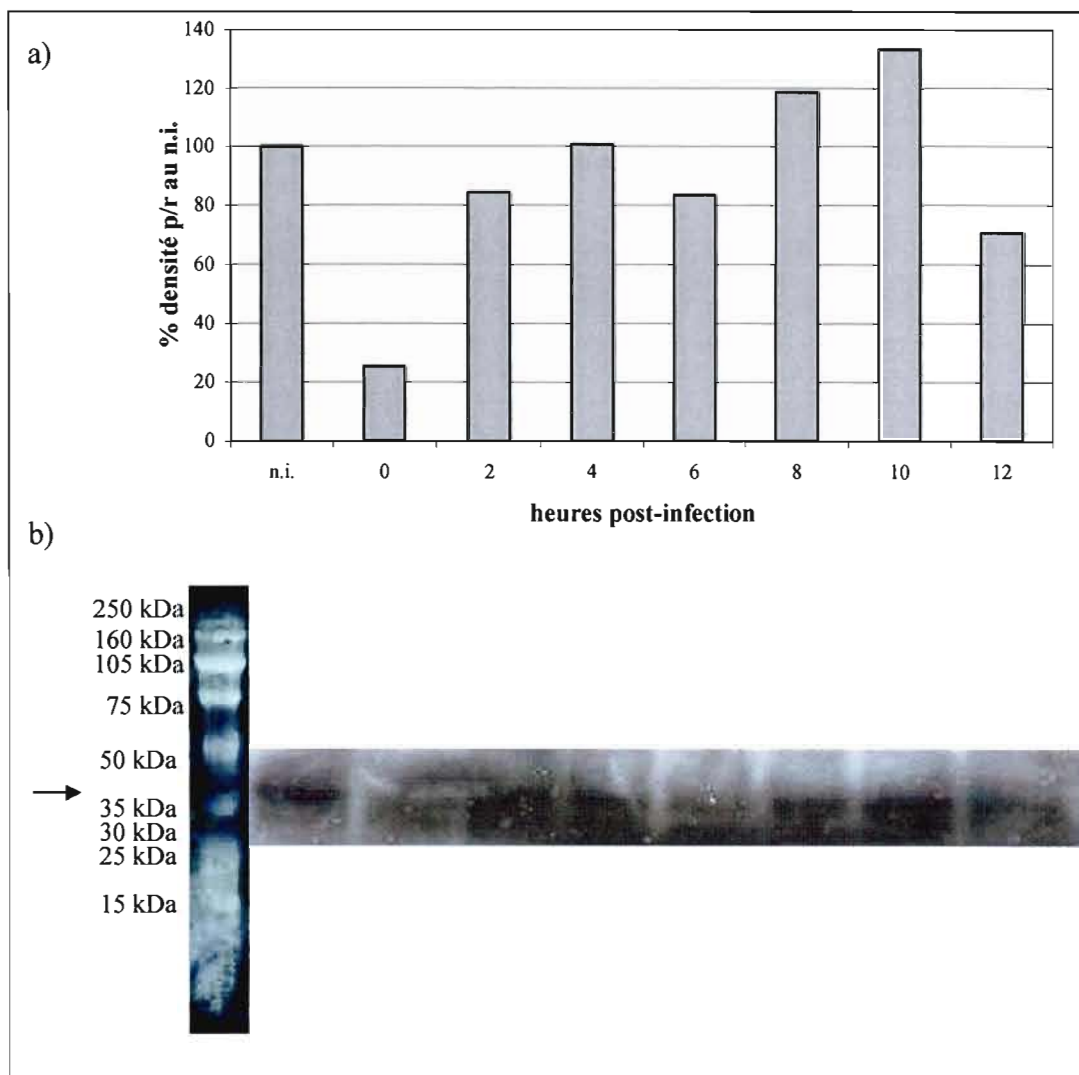


Figure 3.14. Expression de la protéine p-I κ B α à différentes heures (hres) post-infection (p.i.) dans les cellules L929 infectées à une multiplicité de 10 pfu/cellule par le virus T1026. a) La densité des bandes a été quantifiée avec un densitomètre. Les pourcentages obtenus ont été calculés par rapport à la valeur de densité obtenue pour les cellules non infectées (n.i.). b) Une quantité de 40 μ g de protéines totales a été migrée sur un gel d'électrophorèse SDS-PAGE 12% et un transfert par Western a été effectué sur une membrane en fluorure de polyvinylidène (PVDF) (Millipore). L'anticorps anti-p-I κ B α (Cell signaling Technology) a été dilué à 1/2000 et la réaction a été révélée avec un deuxième anticorps anti-IgG de lapin conjugué à la HRP (Horseradish peroxidase) (ECL plus Western blotting detection reagents, Amersham Biosciences).

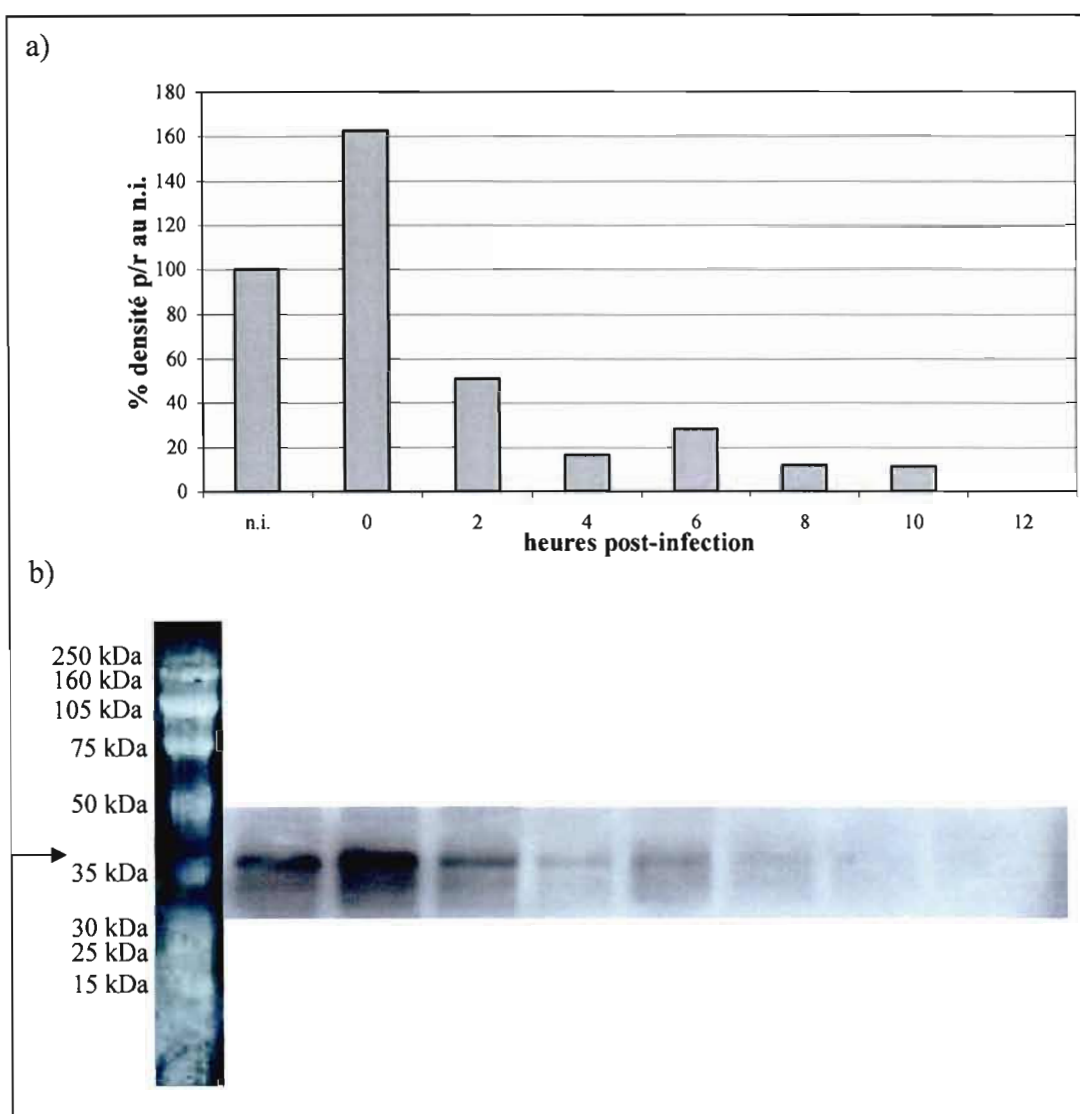


Figure 3.15. Expression de la protéine p-IκBα à différentes heures (hres) post-infection (p.i.) dans les cellules L929 infectées à une multiplicité de 10 pfu/cellule par le virus TP6. a) La densité des bandes a été quantifiée avec un densitomètre. Les pourcentages obtenus ont été calculés par rapport à la valeur de densité obtenue pour les cellules non infectées (n.i.). b) Une quantité de 40 µg de protéines totales a été migrée sur un gel d'électrophorèse SDS-PAGE 12% et un transfert par Western a été effectué sur une membrane en fluorure de polyvinylidène (PVDF) (Millipore). L'anticorps anti-p-IκBα (Cell signaling Technology) a été dilué à 1/2000 et la réaction a été révélée avec un deuxième anticorps anti-IgG de lapin conjugué à la HRP (Horseradish peroxidase) (ECL plus Western blotting detection reagents, Amersham Biosciences).

CHAPITRE IV

DISCUSSION

Le virus de la stomatite vésiculeuse présente des caractéristiques intéressantes pour l'étude des moyens de combattre le cancer. Comme mentionné précédemment, les cellules cancéreuses ont des défauts génétiques qui empêchent la production d'interféron par celles-ci. Le VSV mutant (M51R) peut alors infecter et tuer ces cellules sans qu'il éveille le système immunitaire. Les cellules avoisinantes étant saines, ne seraient pas ou presque pas infectées par VSV, puisque l'IFN- β serait sécrété, le virus mutant étant un bon inducteur d'IFN- β . Le virus sauvage pourrait aussi infecter les cellules cancéreuses, mais aussi les cellules saines, car celui-ci n'induit pas la production d'IFN- β chez les cellules infectées. Il est certain qu'il reste beaucoup de questions sans réponses à ce sujet et il faut donc continuer d'étudier ces virus dits oncolytiques. Dans cette étude, l'effet de l'infection par le virus de la stomatite vésiculeuse de type sauvage et de deux mutants a été étudié. Précisément, l'expression du gène de NF- κ B a été analysée par PCR en temps réel. L'expression de la protéine I κ B α a été analysée par immunobuvardage ainsi que celle de la protéine phosphorylée. Les trois virus; HR, T1026 et TP6, infectent les cellules HeLa et L929 de manière différente et ils amènent donc des effets différents sur l'expression des gènes et des protéines.

Pour commencer, les premières différences ont pu être notées en comparant les ratios de la [ARN total]/[protéines totales] (figures 3.1 et 3.2) obtenus par les deux types cellulaires infectés par les trois virus distincts.

Le virus mutant T1026 possède une mutation (M51R) dans la séquence de la protéine M qui empêche d'inhiber la synthèse d'ARN et des protéines dans les cellules infectées (Ahmed et Lyles 1998; Ahmed *et al.*, 2003). L'infection des cellules HeLa et L929 par T1026 a montré qu'il n'y a pas d'inhibition de la synthèse d'ARN ni de la synthèse protéique après 12 hres d'infection. Les ratios observés permettent d'affirmer que VSV T1026 n'affecte pas la synthèse d'ARN et de protéines. Les résultats obtenus confirment donc les études précédentes (Francoeur *et al.*, 1987; Lyles, 2000). Les variations observées sont causées par des changements au niveau de la concentration d'ARN total obtenue aux temps p.i. concernés. Il n'est pas possible de conclure que la synthèse d'ARN est inhibée à ces temps post-infection. De plus, il s'agit de tests préliminaires se basant sur une seule expérience. Des analyses subséquentes devront être effectuées afin de vérifier et comprendre le résultat observé.

Le virus TP6 est un mutant de VSV possédant une séquence sauvage de la protéine M. Il aurait une mutation dans la séquence de la protéine G (glycoprotéine) qui affecterait la structure bidimensionnelle de la protéine, mais non la structure tertiaire (Mémoire Frédérick Brassard, 2009). L'infection par ce virus cause un effet semblable dans les deux types cellulaires (figures 3.1 et 3.2). C'est-à-dire que dès que le virus est mis en contact avec les cellules (0 hre = 45 minutes), il cause une diminution du ratio [ARN total]/[protéines totales]. Cette diminution peut être expliquée par la réduction des concentrations d'ARN total et de protéines totales dans les cellules infectées. Ceci indique que la présence de la protéine M sauvage implique que les concentrations d'ARN et de protéines totales soient modifiées à la baisse au cours du temps p.i. Il est reconnu que TP6 est un bon inhibiteur de la synthèse protéique (Francoeur *et al.*, 1987), mais il n'était pas connu qu'il cause une diminution de la synthèse d'ARN total chez les cellules infectées. Ces résultats laissent croire que l'inhibition de la transcription de l'ADN en ARN serait à l'origine

de l'inhibition de la synthèse protéique. En le comparant aux deux autres virus, le mutant TP6 est celui qui présente les ratios [ARN total]/[protéines totales] les plus bas et ce dans les deux types cellulaires. De plus il est important de mentionner que cette diminution ne met pas en cause une mutation dans la séquence de M, mais elle serait plutôt dans celle de la protéine G.

Le virus sauvage HR montre un effet différent sur les deux types cellulaires infectés (figures 3.1 et 3.2). Les cellules L929 infectées à une multiplicité de 10 pfu/cellule du virus HR ont eu un ratio relativement stable entre 2 et 10 hres p.i., montrant que les concentrations d'ARN total ou de protéines totales ne semblent pas varier au cours du temps. À 0 hre p.i., qui représente 45 minutes d'absorption du virus, celui-ci ne semble pas causer d'effet à la cellule. À 12 hres, il y a une diminution du ratio de 68% par rapport au ratio obtenu à 10hres p.i. signifiant que la concentration d'ARN à 12 hres p.i. diminue remarquablement. Évidemment, ce résultat était attendu puisque la protéine M est reconnu comme inhibant la synthèse d'ARN et des protéines au cours de l'infection (Francoeur *et al.*, 1987; Ahmed et Lyles, 1998; Ahmed *et al.*, 2003; Kopecky et Lyles, 2003). Cependant il faut remarquer que la transcription et la traduction générales ne sont pas complètement inhibées.

Les cellules HeLa réagissent distinctement à l'infection par HR. À 0 hre p.i. le ratio est plus grand que celui retrouvé chez les cellules L929 au même temps. Donc, l'absorption du virus et le début de sa réplication dans les cellules HeLa semblent avoir un effet sur la synthèse d'ARN. Ensuite, le ratio ne varie pas beaucoup jusqu'à 6 hres p.i., indiquant toujours que les concentrations d'ARN et de protéines totales ne changent pas de la même manière. À 8 hres p.i., le ratio [ARN total]/[protéines totales] chute pour atteindre un ratio semblable à celui des cellules non infectées et ensuite il diminue encore à 10 et 12 hres p.i. pour atteindre un ratio plus bas que celui obtenu par les cellules L929 infectée par HR. Le virus sauvage

inhibe la synthèse d'ARN et des protéines grâce à la protéine M qui a cet effet sur les cellules infectées (Ahmed *et al.*, 2003). Cependant, les cellules HeLa sont affectées de façon plus remarquable par le virus HR que les cellules L929. Cela serait dû au fait que ce sont deux types cellulaires différents. En effet, les cellules HeLa sont des cellules épithéliales qui ne nécessitent pas l'expression *de novo* des gènes pour proliférer rapidement, se différencier et entrer en mort cellulaire (apoptose) rapidement (Kopecky et Lyles, 2003). Tandis que les cellules L929 sont des fibroblastes qui forment les tissus conjonctifs et elles sont responsables de la formation des fibres collagènes, réticuliniques ou élastiques. Elles ne sont donc pas des cellules dont la prolifération, la différenciation et la mort cellulaire se fait rapidement, puisqu'elles nécessitent l'expression *de novo* des gènes. Il se pourrait que les cellules L929 aient une réponse moins hâtive à l'infection par le VSV HR et c'est pourquoi leur synthèse d'ARN et de protéines ne diminue pas beaucoup.

En regardant les résultats de ratios ARN/protéines, il est possible de dire que durant les huit premières heures post infection, il y a de l'ARN et des protéines détectables dans les deux types cellulaires. Ce dosage a été fait pour les quantités totales présentes dans les cellules infectées et non pour un ARN ou une protéine en particulier. Il serait possible d'affirmer que ces ratios pourraient contenir l'ARN viral et ribosomal ainsi que des protéines virales qui augmentent durant les premières heures p.i. Cependant, ceci doit être vérifié car comme mentionné dans le chapitre II, ces analyses ont été faites une fois. Pour que ces résultats aient plus de poids scientifique, les analyses d'ARN et des protéines devraient être réalisées au moins trois fois et des écart-types seraient effectués.

En seconde partie de ce travail, il a été question d'analyser l'expression du gène du NF- κ B lors de l'infection par le VSV. Cette analyse a été réalisée à l'aide de la méthode de PCR en temps réel. Des résultats ont pu être obtenus pour les virus HR et TP6 et seulement lors de l'infection des cellules L929 (figure 3.3). Des problèmes répétés de contamination ont eu lieu avec les amorces et les sondes destinées aux

cellules HeLa empêchant la quantification relative du NF- κ B dans ces cellules. Le virus sauvage HR a un effet particulier sur l'expression du gène du NF- κ B. Durant les premières 45 minutes d'absorption du virus, il y a déjà un effet de l'infection puisque le ratio diminue. Donc l'entrée du virus HR dans les cellules L929 provoque la diminution de l'expression du gène de NF- κ B. Entre 0 et 6 hres p.i., il y a une diminution graduelle du ratio d'expression jusqu'à atteindre la moitié (0.53) du ratio des cellules non infectées. Ce résultat confirme la deuxième partie de l'hypothèse initiale, qui était que le virus HR réduit l'expression du gène de NF- κ B. La réduction d'expression du gène pourrait expliquer le manque d'activation du facteur NF- κ B observée par Boulares, Ferran et Lucas-Lenard en 1996. Cette équipe avait trouvé que lorsque des cellules L929 sont infectées par le virus HR, ce facteur de transcription était activé seulement après 4 hres d'infection. En plus, ils avaient observé une augmentation de l'activation à 10 hres p.i. et lors de l'expérience présente, il y a une augmentation marquée du ratio d'expression (1.27) à 10 hres p.i. En sachant que l'expression de l'IFN- β est en partie modulée par la liaison du NF- κ B au domaine PRDII du promoteur, il se pourrait que l'inhibition de l'expression de l'IFN- β par le VSV sauvage soit causée par la diminution de l'expression du gène du NF- κ B. Un point intéressant est que l'expression du NF- κ B n'est pas inhibée complètement par l'infection du VSV HR malgré la présence de la protéine M sauvage. En effet, à 8 hres p.i., il y a une augmentation de l'expression du gène. Donc, même si la protéine M est connue comme inhibant la transcription générale de l'hôte, il y a synthèse d'ARN, ce qui amène la possibilité que la protéine M n'est pas la seule actrice dans l'inhibition de l'expression de l'IFN- β . De plus, ceci vient prouver aussi que la seule présence du NF- κ B à 8 hres p.i. dans la cellule ne suffit pas à activer le promoteur IFN- β , puisqu'il est connu qu'à ces heures post-infection avec le virus sauvage, il n'y a pas d'IFN- β induit (Boulares, Ferran et Lucas-Lenard, 1996). Dans ce système, cette affirmation n'a pas été confirmée puisqu'elle n'y a pas eu d'analyse de l'expression de l'IFN- β . Il faudrait vérifier l'expression de l'IFN- β , vérifier du côté de IRF-1 (Fujita *et al.*, 1989; Reis *et al.*, 1992; Thanos, 1996) et IRF-

3 (Shaw *et al.*, 2005) qui sont des facteurs de transcription importants dans l'induction de l'IFN- β .

L'expression du NF- κ B est toute autre lors de l'infection par le virus mutant TP6. Ce virus est connu comme étant un très bon inducteur d'IFN- β . Les résultats sur l'expression du gène du NF- κ B vont en ce sens. En effet, la quantité de ce gène augmente au cours du temps lors de l'infection des cellules L929 par TP6. Ce fait répond à la première partie de l'hypothèse initiale, c'est-à-dire que les virus TP6 et T1026 permettent l'expression du gène du NF- κ B. Il a été impossible de vérifier l'expression de ce gène lors de l'infection par T1026, mais des tests préliminaires laissent croire que le résultat serait semblable à celui obtenu avec TP6. Malgré le fait que ce virus possède la protéine M sauvage, il n'inhibe pas l'induction de l'IFN- β (Francoeur *et al.*, 1987). Ceci amène l'éventualité de l'existence d'un inhibiteur particulier de l'IFN- β que le mutant TP6 ne possède plus, mais que le virus HR a puisqu'il est sauvage. Le virus TP6 est capable d'induire l'interféron, contrairement au virus sauvage. TP6 a été isolé par des essais sur plaque après de nombreux passages, il a sûrement acquis une mutation ailleurs dans son génome qui a eu pour effet de ne pas inhiber la production d'interféron dans les cellules infectées. Cette mutation pourrait être sur une protéine virale autre que M. Une homologie peut être faite avec le virus Sendai qui possède des protéines C et C' qui agissent au niveau de l'induction de l'état antiviral arbitré par l'interféron (Garcin *et al.*, 1999). VSV possède aussi de telles protéines n'étant pas bien connues mais qui semblent être impliquées dans la pathogenèse virale. De plus, selon des travaux effectués par Frédéric Brassard en 2009 dans notre laboratoire, il y aurait une mutation dans la séquence la protéine G de VSV. Cette protéine est celle qui est reconnue comme l'antigène de VSV. Il faudrait vérifier si cette mutation a un effet sur la production d'IFN- β par les cellules infectées par VSV.

Un aspect important à ne pas oublier est celui de l'apoptose. Le VSV sauvage

(HR) est connu comme induisant l'apoptose chez les cellules infectées comme expliqué dans le contexte théorique. Le virus TP6 est aussi un bon inducteur d'apoptose, comme HR tandis que T1026 ne l'est pas (Desforges *et al.*, 2002). TP6 possède donc des caractéristiques des deux virus en ayant une séquence de la protéine M étant sauvage.

Comme mentionné préalablement, la quantification relative par PCR en temps réel a été utilisée afin de quantifier le gène du NF- κ B. La qualité de l'ARN, la variabilité causée par le manipulateur et la réaction de transcription inverse elle-même, sont des variables techniques qui font paraître la PCR en temps réel comme une technique fragile. Mais à présent cette technique est la plus sensible pour la détection des ARNm. Cette méthode est rapide et hautement reproductible (Bustin et Nolan, 2004; Tichopad *et al.*, 2004). Il existe d'autres méthodes qui auraient pu être utilisées, comme les Northern Blot et même la méthode de protection de la ribonucléase. La PCR doit être effectuée en le moins d'étapes possible pour éviter les risques de contamination et chacune de celles-ci a dû être standardisée pour passer à la suivante.

La dernière partie de cette recherche a été axée sur l'analyse de la présence de la protéine I κ B α et I κ B α phosphorylée dans les extraits de cellules HeLa et L929 infectées par HR, T1026 et TP6 (figures 3.4 à 3.15). Cette analyse a été fait par immunobuvardage comme expliqué dans le chapitre II. Comme mentionné dans l'introduction, la protéine I κ B α est dégradée si elle est phosphorylée, libérant ainsi NK- κ B qui peut aller activer l'expression de l'IFN- β . L'analyse de la protéine phosphorylée a été effectuée afin de pouvoir vérifier s'il y a une relation entre la quantité d'I κ B α et I κ B α -phosphorylée lors de l'infection des cellules HeLa et L929 par les trois virus. L'hypothèse était que l'expression de la sous unité I κ B α serait plus faible dans les cellules infectées par les virus TP6 et T1026 que par HR. Lors de l'infection par le virus HR, les cellules HeLa et L929 montrent une diminution de la

quantité d'I κ B α au cours du temps (figures 3.4 et 3.7). Cette diminution est moins marquée dans les cellules L929. Ce résultat montre le contraire de ce qui était attendu. Dans les deux types cellulaires, l'expression de la protéine I κ B α est plus importante lorsque les cellules sont infectées par T1026 (figures 3.5 et 3.8) et TP6 (figures 3.6 et 3.9). Cependant, il y a une diminution au cours du temps post-infection lors de l'infection des cellules HeLa et L929 par TP6. Une augmentation de I κ B α au cours du temps est observée dans deux types cellulaires infectés par T1026. Celui-ci n'est pas un bon inhibiteur de la synthèse protéique et ce serait une des raisons qui expliquerait les niveaux d'expression de la protéine. TP6 est un bon inhibiteur de la synthèse protéique et il permet quand même l'expression de la protéine, ce qui vient s'accorder avec le résultat obtenu avec le ratio [ARN total]/[protéines totales]. Le degré de phosphorylation de la protéine I κ B α diminue lors de l'infection des cellules HeLa et L929 par HR (figure 3.10 et 3.13, respectivement). La protéine phosphorylée est presque absente des extraits cellulaires. Lors de l'infection par TP6, la quantité de protéine phosphorylée diminue dans les deux types cellulaires (figures 3.12 et 3.15). Ces diminutions ne correspondent pas à une augmentation de la quantité de I κ B α . T1026 a un effet différent des deux autres virus sur la quantité de p-I κ B α et ce dans les deux types cellulaires (figures 3.11 et 3.14). En effet, la quantité augmente au cours du temps post infection. Ceci devrait se traduire par une diminution au cours du temps de I κ B α , mais ce n'est pas ce qui est observé. Une augmentation de la protéine phosphorylée devrait augmenter la dégradation de I κ B α et donc une augmentation de la liaison de NF- κ B au promoteur de l'IFN β . Ces résultats ne permettent pas de conclure que l'inhibition de NF- κ B se fait par l'intermédiaire de l'expression de I κ B α . D'autres études devraient être accentuées sur les deux premières heures post-infection où il semble se passer quelque chose pour TP6. Il est possible de dire que le virus HR est le meilleur inhibiteur de l'expression de la protéine I κ B α sous ses deux formes et dans les deux types cellulaires et il est celui qui inhibe l'expression de l'IFN- β . Celle-ci est donc, dans le cas de HR, due à l'inhibition générale de l'expression des gènes et des protéines et

non à la régulation de NF- κ B par I κ B. Pour T1026, l'expression de l'IFN- β ne semble pas être régulée par les changements de la protéine I κ B α . Cependant, s'il y a beaucoup de protéine phosphorylée, il y a beaucoup de dégradation et aussi une accumulation rapide de I κ B α nouvellement synthétisé dans le cytoplasme (Baldwin, 1996). Cette «ré-accumulation» impliquerait une boucle de répression post-induction de NF- κ B. TP6 quant à lui, semble modifier de manière importante l'expression de la protéine I κ B α sous ses deux formes dans les cellules L929. La forte phosphorylation à 0 hre pourrait vouloir dire qu'il induit une liaison de NF- κ B au promoteur de l'IFN- β au début de l'infection. Mais l'expression de I κ B α reste la même au courant de l'infection. De plus, les résultats de PCR ont montré une augmentation de l'expression de l'ARNm du gène NF- κ B dans les mêmes cellules. Donc, il se pourrait que pour TP6, NF- κ B et I κ B α soient impliqués dans la régulation de l'induction de l'IFN- β , mais d'autres recherches restent encore à faire et celle-ci n'est que la première en ce sens.

De plus, un point important à se rappeler est que le nombre de réplicats de ces manipulations n'est pas suffisant et il faudra les refaire avec une protéine de référence comme l'actine sur les immunobuvardages.

CHAPITRE V

CONCLUSION

La recherche fondamentale sur les virus a permis de découvrir un grand nombre d'aspects de la biologie moléculaire et cellulaire. L'étude réalisée lors de cette maîtrise a ouvert de nouvelles portes sur l'infection par VSV. En effet, il a été possible d'analyser l'expression du gène de NF- κ B dans les cellules L929 infectées par HR et TP6 par la technique de PCR en temps réel et il a été possible d'analyser l'expression et la phosphorylation de la protéine I κ B α dans les cellules HeLa et L929 infectées par HR, TP6 et T1026. La technique de PCR en temps réel a été utilisée pour la première fois au laboratoire et il reste donc à la mettre en application pour une multitude d'autres gènes.

Les résultats obtenus pour le virus TP6 sont les premiers de la sorte, puisqu'il n'y a pas de travaux à avoir été effectués en ce sens auparavant. Il faudrait refaire des tests d'infection virale sur les mêmes types cellulaires et analyser les ARN viraux nouvellement produits pour voir s'ils influencent la quantité d'ARN total extrait des cellules. Il reste encore beaucoup de recherche à faire pour comprendre pourquoi il y a une si grande différence de réponse lors de l'infection par ce virus par rapport au virus HR, même s'ils possèdent la même protéine M. Par exemple, le séquençage du génome de TP6 a été fait par un collègue du laboratoire et il a identifié une mutation dans la séquence de G. Il faudrait refaire des analyses de séquençages pour s'assurer qu'il s'agit bien de la seule mutation. Les résultats sur l'expression du gène de NF- κ B ont montré que ce gène est régulé à la hausse (TP6) ou à la baisse (HR) lors de l'infection par VSV. TP6 est un bon inducteur d'IFN β , alors le résultat obtenu va en ce sens. Il faudrait alors montrer que NF- κ B se lie au promoteur de l'IFN β par un test

de «gel-shift» ou «supershift».

Si les résultats des analyses sur I κ B α ne permettent pas de conclure avec certitude que cette sous unité est impliquée dans la réponse au VSV, il y a une autre voie que celle de I κ B α menant à l'activation ou désactivation de NF- κ B qui est mise en œuvre. Une analyse de l'activation de la voie des TLR devrait également être faite. Le VSV serait reconnu par le TLR7 dans les endosomes (Diebold, 2008; Xagorari et Chlichlia, 2008). Les protéines impliquées dans la cascade sont MyD88, IRF-7, IRAK, TRAF-6 et plusieurs autres qui pourraient être étudiées lors de l'infection par VSV.

Une autre voie de recherche intéressante serait celle reliée au transport nucléaire des protéines. VSV est connu comme inhibant le transport nucléocytoplasmique dans les cellules infectées (Gustin, 2003). Il serait approprié d'approfondir sur ce sujet en lien avec l'activation de NF- κ B et la production d'IFN β .

APPENDICE A

RÉSULTATS BRUTS

Figures	Page
A.1 Courbe standard de PCR en temps réel pour le gène de référence HPRT1.....	69
A.2 Courbe standard de PCR en temps réel pour le gène cible NF- κ B.....	70
A.3 Résultat brut de PCR en temps réel pour le gène HPRT1 obtenu à partir d'extraits d'ARN total provenant de cellules L929 infectées par le virus HR.....	71
A.4 Résultat brut de PCR en temps réel pour le gène HPRT1 obtenu à partir d'extraits d'ARN total provenant de cellules L929 infectées par le virus TP6.....	72
A.5 Résultat brut de PCR en temps réel pour le gène NF- κ B obtenu à partir d'extraits d'ARN total provenant de cellules L929 infectées par le virus HR.....	73
A.6 Résultat brut de PCR en temps réel pour le gène NF- κ B obtenu à partir d'extraits d'ARN total provenant de cellules L929 infectées par le virus TP6.....	74

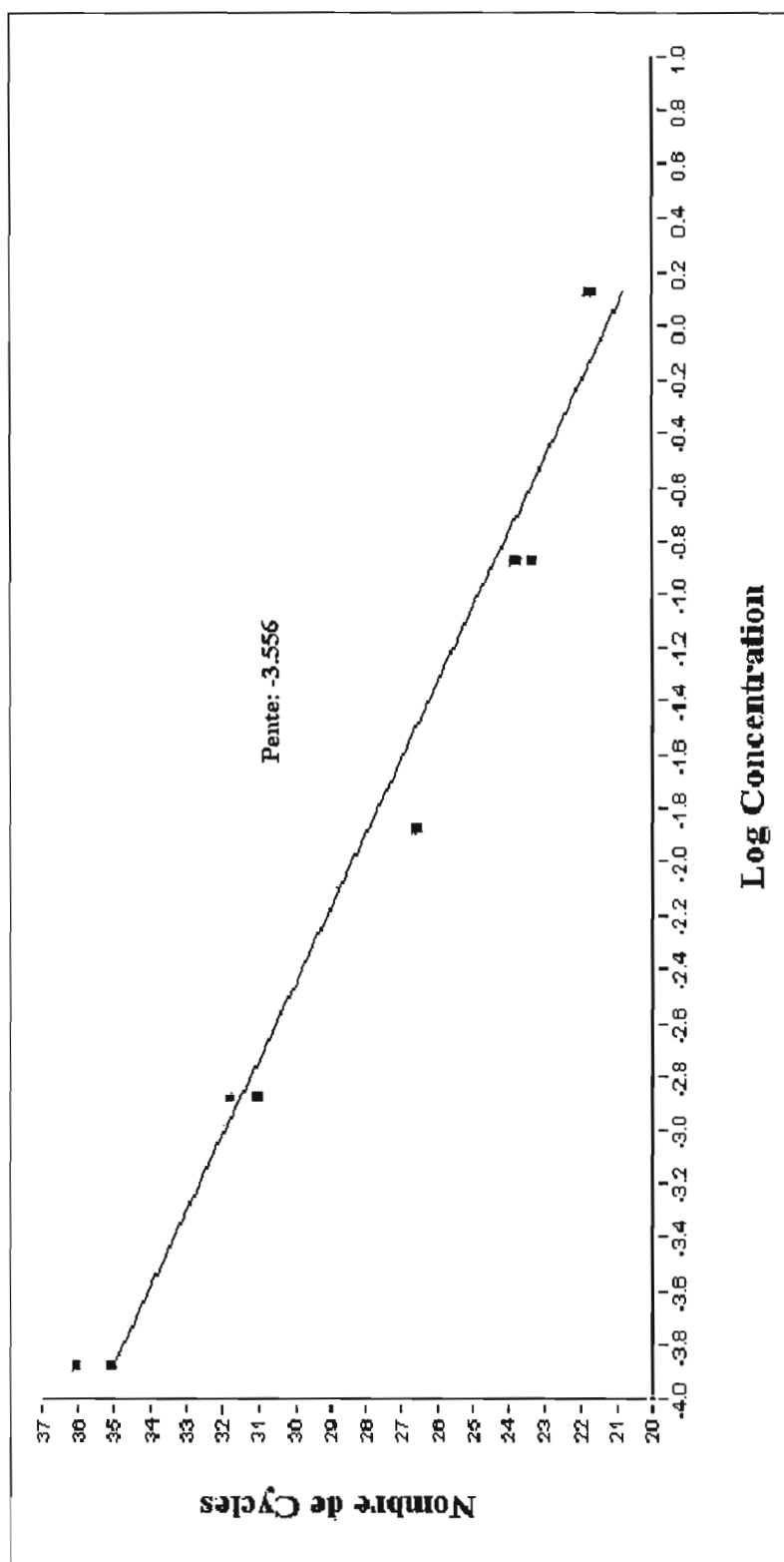


Figure A.1. Courbe standard réalisée pour le gène de référence HPR T1 en fonction du logarithme de la concentration en ARN utilisée. La RT-PCR a été performée en utilisant le kit QuantiTect Gene expression Assay et le kit QuantiTect Probe RT-PCR de Qiagen sur des extraits de protéines L929 non infectées.

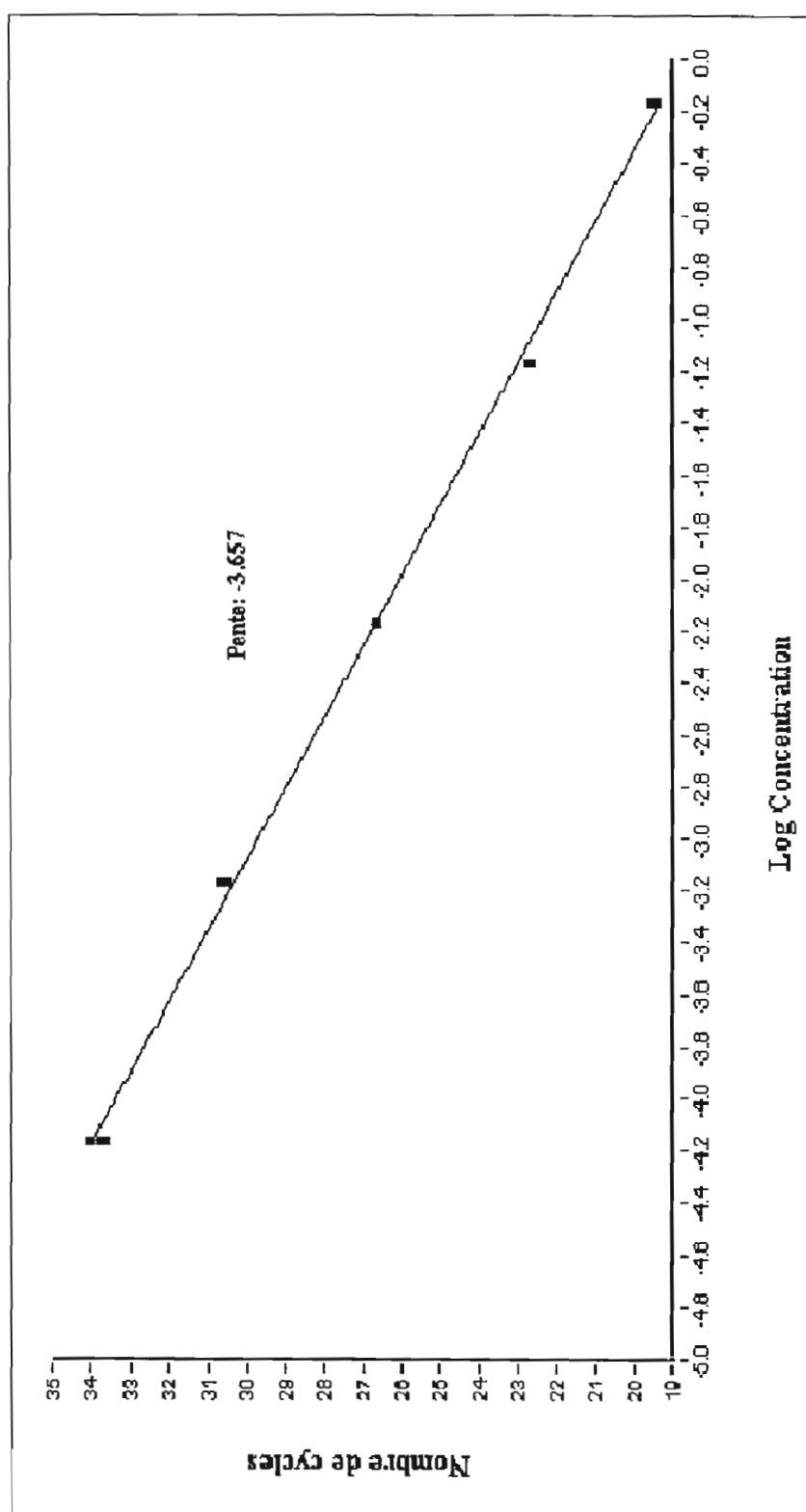


Figure A.2. Courbe standard réalisée pour le gène cible NF-κB en fonction du logarithme de la concentration en ARN utilisée. La RT-PCR a été performée en utilisant le kit QuantiTect Gene expression Assay et le kit QuantiTect Probe RT-PCR de Qiagen sur des extraits de protéines L929 non infectées.

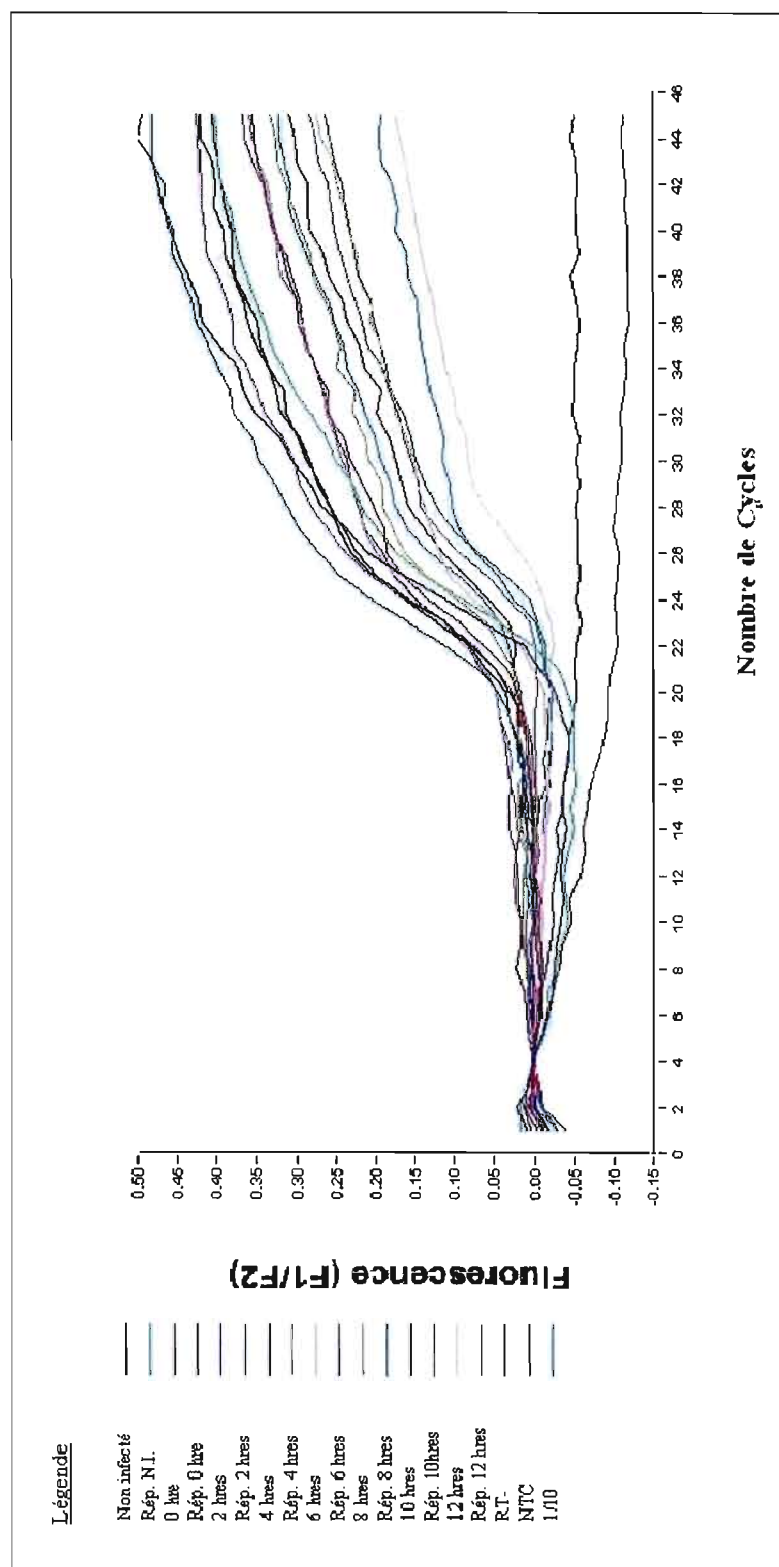


Figure A.3. Résultat brut de PCR en temps réel pour le gène HPRT1, obtenu à partir d'extraits d'ARN total provenant de cellules L929 infectées par le virus HR et prélevés aux différentes heures post-infection. La RT-PCR a été performée en utilisant le kit QuantiTect Gene expression Assay et le kit QuantiTect Probe RT-PCR de Qiagen.

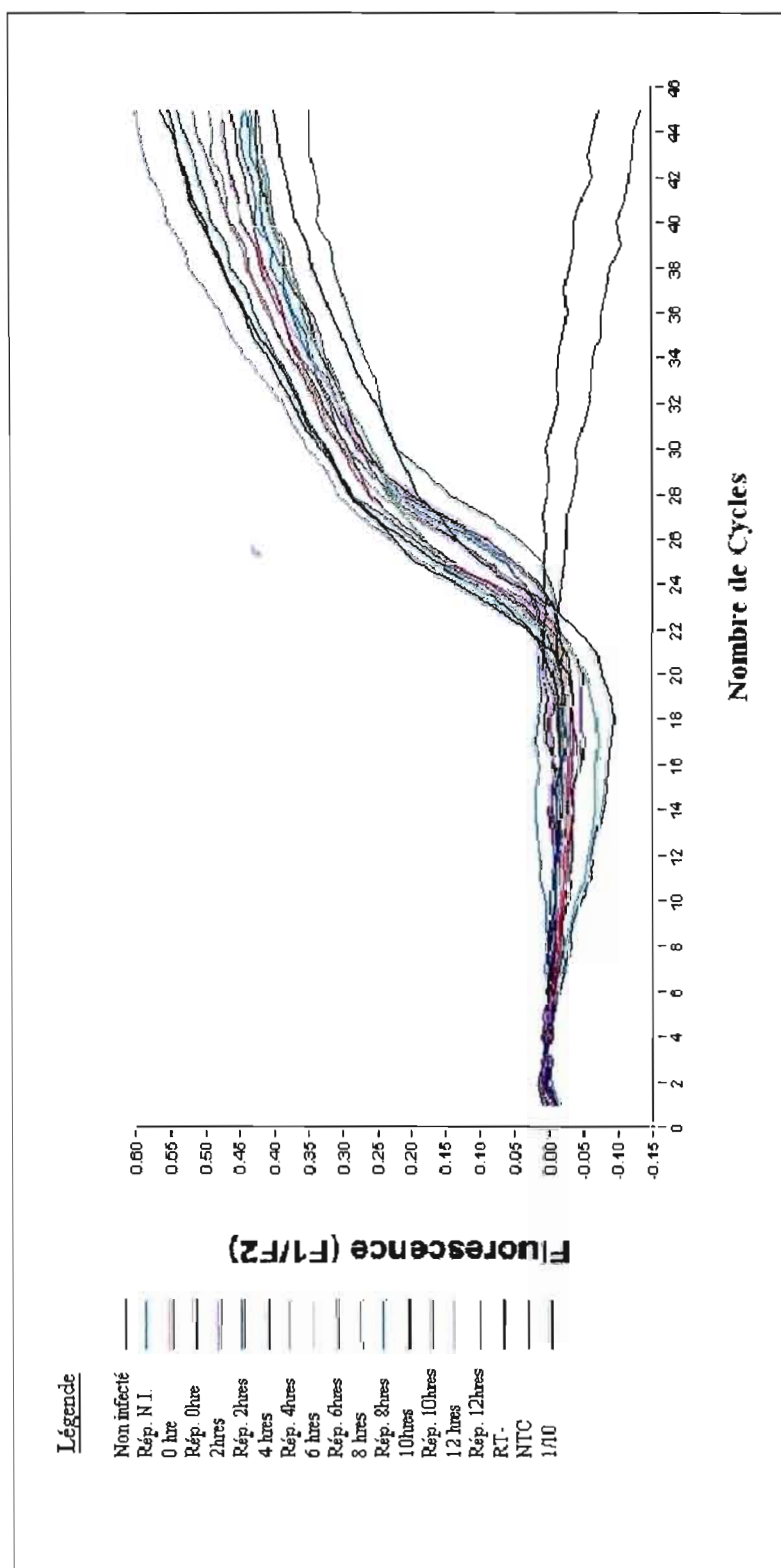


Figure A.4. Résultat brut de PCR en temps réel pour le gène HPRT1, obtenu à partir d'extraits d'ARN total provenant de cellules L929 infectées par le virus TP6 et prélevés aux différentes heures post-infection. La RT-PCR a été effectuée en utilisant le kit QuantiTect Gene expression Assay et le kit QuantiTect Probe RT-PCR de Qiagen.

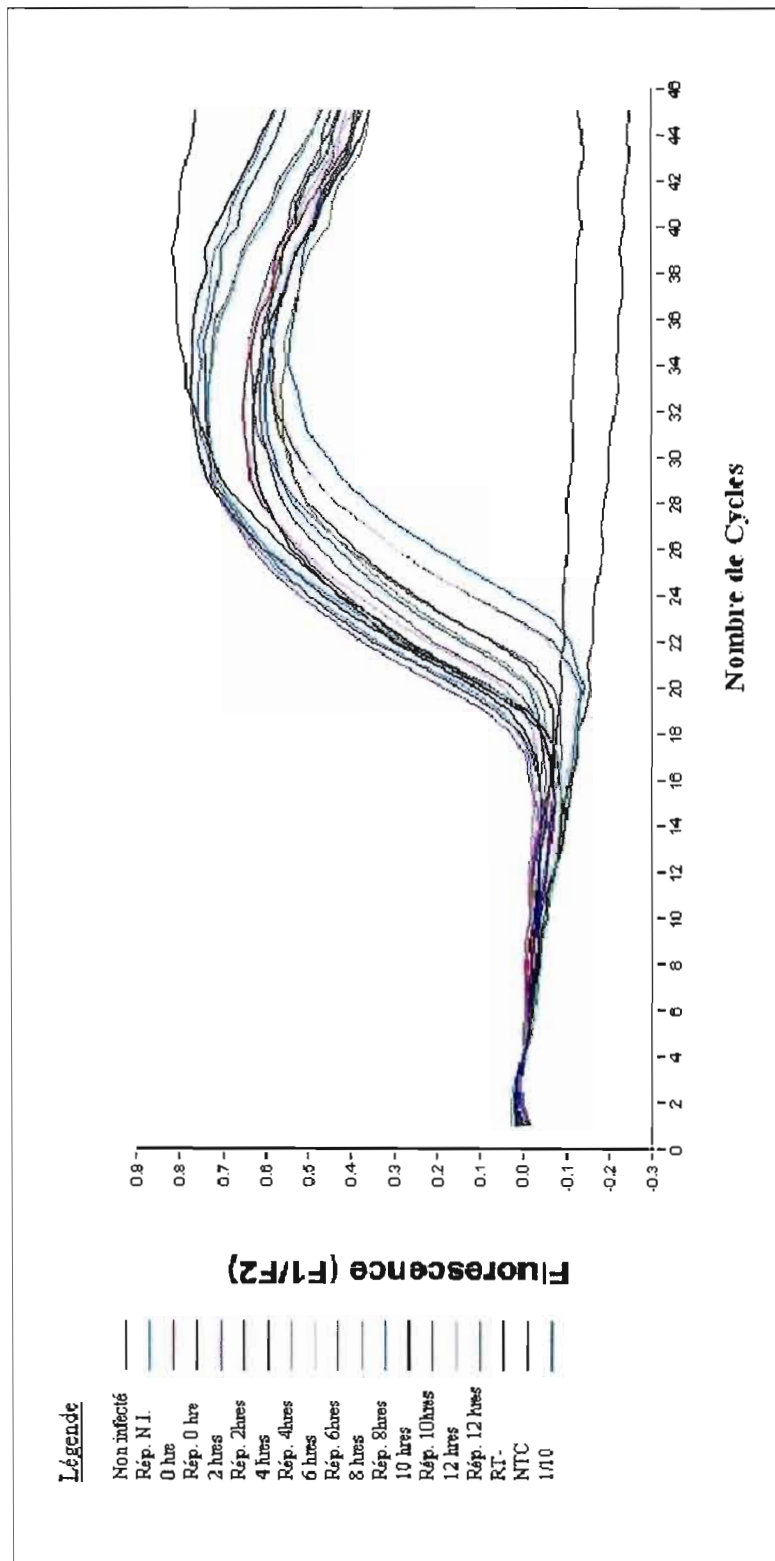


Figure A.5. Résultat brut de PCR en temps réel pour le gène NF- κ B, obtenu à partir d'extraits d'ARN total provenant de cellules L929 infectées par le virus HR et prélevés aux différentes heures post-infection. La RT-PCR a été performée en utilisant le kit QuantiTect Gene expression Assay et le kit QuantiTect Probe RT-PCR de Qiagen.

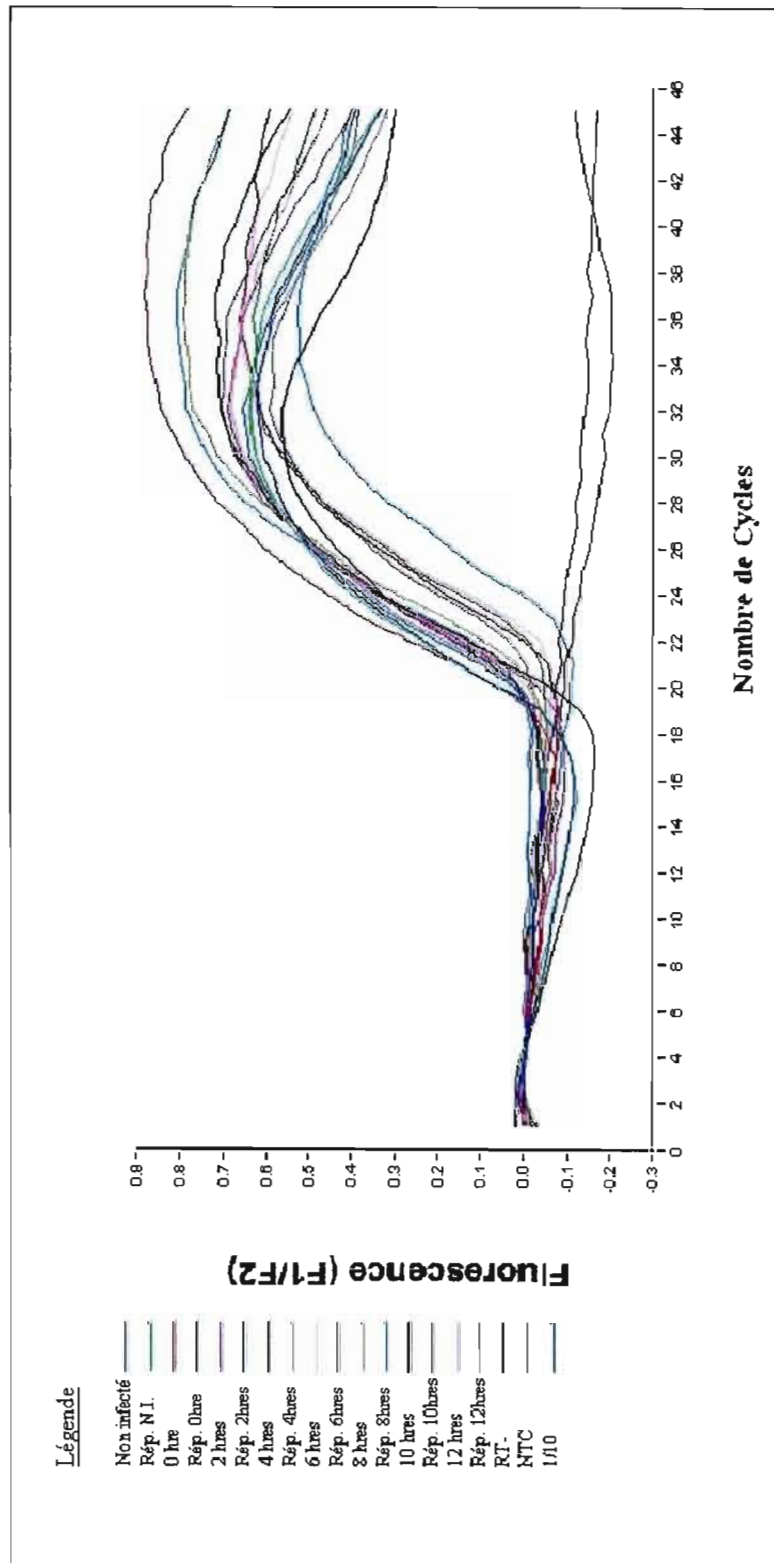


Figure A.6. Résultat brut de PCR en temps réel pour le gène NF-kB, obtenu à partir d'extraits d'ARN total provenant de cellules L929 infectées par le virus TP6 et prélevés aux différentes heures post-infection. La RT-PCR a été performée en utilisant le kit QuantiTect Gene expression Assay et le kit QuantiTect Probe RT-PCR de Qiagen.

RÉFÉRENCES

1. AHMED M., LYLES D. S. 1998. Effect of vesicular stomatitis virus matrix protein on transcription directed by host RNA polymerases I, II and III. *Journal of Virology*. Vol. 72. No. 10. p. 8413-8419.
2. AHMED M., McKENSIE M. O., PUCKETT S., HOJNACKI M., POLIQUIN L., LYLES D. 2003. Ability of the matrix protein of vesicular stomatitis virus to suppress beta interferon gene expression is genetically correlated with the inhibition of the host RNA and protein synthesis. *Journal of Virology*. Vol. 77. No. 9. p. 4646-4657.
3. ALGARTÉ M., NGUYEN H., HEYLBROECK C., LIN R., HISCOTT J. 1999. I κ B-mediated inhibition of virus-induced beta interferon transcription. *Journal of Virology*. Vol. 73. No. 4. p. 2694-2702.
4. BAEUERLE P. A., BALTIMORE D. 1988. I κ B: A specific inhibitor of the NF- κ B transcription factor. *Science*. Vol. 242. No. 4878. p. 541-546.
5. BALACHANDRAN S., ROBERTS P. C., KIPPERMAN T., BHALLA K. N., COMPANS R. W., ARCHER D. R., BARBER G. N. 2000. Alpha/Beta interferons potentiate virus-induced apoptosis through activation of the FADD/Caspase-8 death signalling pathway. *Journal of Virology*. Vol. 74. No. 3. p. 1513-1523.
6. BALACHANDRAN S., POROSNICU M., BARBER G. N. 2001. Oncolytic activity of vesicular stomatitis virus is effective against tumors exhibiting aberrant p53, Ras, or Myc function and involves the induction of apoptosis. *Journal of Virology*. Vol. 75. No. 7. p. 3474-3479.
7. BALDWIN, JR. A. S. 1996. The NF- κ B and the I κ B proteins: New discoveries and insights. *Annual Reviews of Immunology*. Vol. 14. p. 649-681.
8. BEG A. A., FINCO T. S., NANTERMET P. V., BALDWIN, JR. A. S. 1993. Tumor necrosis factor and interleukin-1 lead to phosphorylation and loss of I κ B α : a mechanism for NF- κ B activation. *Molecular and Cellular Biology*. Vol. 13. No. 6. p. 3301-3310.
9. BELL J. C., LICHTY B., STOJDL D. 2003. Getting oncolytic virus therapies off the ground. *Cancer Cell*. Vol. 4. No. 1. p. 7-11.

10. BERKOWITZ B., HUANG D.-B., CHEN-PARK F.E., SIGLER P.B., GHOSH G. 2002. The X-ray crystal structure of the NF- κ B p50-p65 heterodimer bound to the interferon β - κ B site. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 277. No. 27. p. 24694-24700.
11. BLACK B. L., RHODES R. B., McKENZIE M., LYLES D. S. 1993. The role of vesicular stomatitis virus matrix protein in inhibition of host-directed gene expression is genetically separable from its function in virus assembly. *Journal of Virology*. Vol. 67. No. 8. p. 4814-4821.
12. BLONDEL D., HARMISON G. G., SHUBERT M. 1990. Role of matrix protein in cytopathogenesis of vesicular stomatitis virus. *Journal of Virology*. Vol. 64. No. 4. p. 1716-1725.
13. BOULARES A. H., FERRAN M. C., LUCAS-LENARD J. M. 1996. NF- κ B activation is delayed in mouse L929 cells infected with interferon suppressing but not inducing, vesicular stomatitis virus strains. *Virology*. Vol. 278. No. 167. p. 71-80.
14. BUSTIN S. A., NOLAN T. 2004. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Journal of Biomolecular Techniques*. Vol. 15. No. 3. p.155-166.
15. BUZZI N., BOLAND R., RUSSO de BOLAND A. 2010. Signal transduction pathway associated with ATP-induced proliferation of colon adenocarcinoma cells. *Biochimica et Biophysica Acta*. Vol. 1800, No. 9. p. 946-955
16. CHIAO P. J., MIYAMOTO S., VERMA I. M. 1994. Autoregulation of I κ B α activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Vol. 91. No. 1. p. 28-32.
17. DELHASE M., HAYAKAWA M., CHEN Y., KARIN M. 1999. Positive and negative regulation of I κ B kinase activity through IKK β subunit phosphorylation. *Science*. Vol. 284. No. 5142. p. 309-313.
18. DeLUCA C., ROULSTON A., KOROMILAS A., WAINBERG M. A., HISCOTT J. 1996. Chronic human immunodeficiency virus type 1 infection of myeloid cells disrupts the autoregulatory control of the NF- κ B/Rel pathway via enhanced I κ B α degradation. *Journal of Virology*. Vol. 70. No. 8. p. 5183-5193.
19. de MATTOS C.A., de MATTOS C.C., RUPPRECHT C.E. 2001. Chapitre 39: Rhabdoviruses. *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins. 4^e edition.

Vol.1 en cd. p.3280.

20. DESFORGES M., DESPARS G., BÉRARD S., GOSSELIN M., McKENSIE M.O., LYLES D., TALBOT P., POLIQUIN L. 2002. Matrix protein mutations contribute to inefficient induction of apoptosis leading to persistent infection of human neural cells by Vesicular stomatitis virus. *Virology*. Vol. 295. No. 1. p. 63-73.
21. DESFORGES M., CHARRON J., BÉRARD S., BEAUSOLEIL S., STOJDL D. F., DESPARS G., LAVERDIÈRE B., BELL J.C., TALBOT P. J., STANNERS C. P., POLIQUIN L. 2001. Different host-cell shutoff strategies related to the matrix protein lead to persistence of vesicular stomatitis virus mutants on fibroblast cells. *Virus research*. Vol. 76. No. 1. p. 87-102.
22. DIEBOLD S. S. 2008. Recognition of viral single-stranded RNA by Toll-like receptors. *Advanced Drug Delivery Reviews*. Vol. 60. p. 813-823.
23. DODD D., GIDDINGS JR. T.H., KIRKEGAARD K. 2001. Poliovirus 3A protein limits interleukin-6 (IL-6), IL-8 and beta interferon secretion during viral infection. *Journal of virology*. Vol. 75. No. 17. p. 8158-8165.
24. DU W., THANOS D., MANIATIS T. 1993. Mechanisms of transcriptional synergism between distinct virus-inducible enhancer elements. *Cell*. Vol. 74. No. 5. p. 887-898.
25. DURBIN R.K., MERTZ S.E., KOROMILAS A.E., DURBIN J.E. 2002. PKR protection against intranasal vesicular stomatitis virus infection is mouse strain dependent. *Viral Immunology*. Vol.15. No. 1. p.41-51.
26. FAUQUET C.M., FARGETTE D. 2005. International committee on taxonomy of viruses and the 3,142 unassigned species. *Virology Journal*. Vol. 2. p. 64-73.
27. FERRAN M. C., LUCAS-LENARD J. M. 1997. The vesicular stomatitis virus matrix protein inhibits transcription from the human beta interferon promoter. *Journal of Virology*. Vol. 71. No. 1. p. 371-377.
28. FLINT S.J., ENQUIST L.W., KRUG R.M., RACANIELLO V.R., SKALKKA A.M. 2000. Principles of Virology. Molecular biology, pathogenesis, and control. American Society of Microbiology. 804 p.
29. FRANCOEUR A. M., POLIQUIN L., STANNERS C.P., 1987. The isolation of interferon-inducing mutants of vesicular stomatitis virus with altered viral P function for the inhibition of total protein synthesis. *Virology*. Vol. 160. No. 1.

p. 236-245.

30. FROESE N., SCHWARZER M., NIEDICK I., FRISCHMANN U., KÖSTER M., KRÖGER A., MUELLER P.P., NOURBAKHS M., PASCHE B., REINMANN J., STAEHLI P., HAUSER H. 2006. Innate immune responses in NF- κ B repressing factor deficient mice. *Molecular and cellular biology*. Vol. 26. No. 1. p. 293-302.
31. FUJITA T., KIMURA Y., MIYAMOTO M., BARSOUMIAN E.L. et TANIGUCHI T. 1989. Induction of endogenous IFN- α and IFN- β genes by a regulatory transcription factor, IRF-1. *Nature*. Vol. 337. No. 6204. p. 270-272.
32. GADDY D. F., LYLES D. 2005. Vesicular stomatitis viruses expressing wild-type or mutant M proteins activate apoptosis through distinct pathways. *Journal of Virology*. Vol. 79. No. 7. p. 4170-4179.
33. GARCIN D., LATORRE P., KOLAKOSKY D. 1999. Sendai virus C proteins counteract the interferon mediated induction of an antiviral state. *Journal of virology*. Vol. 73. No. 8. p. 6559-6565.
34. GRIMM S., BAEUERLE P. A. 1993. The inducible transcription factor NF- κ B: structure-function relationship of its protein subunits. *Biochemical Journal*. Vol. 290. No. 2. p. 297-308.
35. GUSTIN K.E. 2003. Inhibition of nucleo-cytoplasmic trafficking by RNA viruses: targeting the nuclear pore complex. *Virus Research*. Vol. 95. No.1-2. p. 35-44.
36. GUSTIN J. A., OZES O. N., AKCA H., PINCHEIRA R., MAYO L. D., LI Q., GUZMAN J. R., KORGONKAR C. K., DONNER D.B. 2004. Cell type-specific expression of the I κ B kinases determines the significance of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signalling to NF- κ B activation. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 279. No. 3. p. 1615-1620.
37. HEISSMEYER V., KRAPPMANN D., HATADA E. N., SCHEIDEREIT C. 2001. Shared pathways of I κ B kinase-induced SCF ^{β TrCP}-mediated ubiquitination and degradation for the NF- κ B precursor p105 and I κ B α . *Molecular and Cellular Biology*. Vol. 21. No. 4. p. 1024-1035.
38. HER L-S., LUND E., DAHLBERG J. E. 1997. Inhibition of Ran guanosine triphosphatase-dependent nuclear transport by the matrix protein of vesicular stomatitis virus. *Science*. Vol. 276. No. 5320. p. 1845-1848.

39. HISCOTT J., KWON H., GÉNIN P. 2001. Hostile takeovers: viral appropriation of the NF- κ B pathway. *The Journal of Clinical Investigation*. Vol. 107. No. 2. p. 143-152.
40. HUANG T. T., KUDO N., YOSHIDA M., MIYAMOTO S. 2000. A nuclear export signal in the N-terminal regulatory domain of I κ B α controls cytoplasmic localization of inactive NF- κ B/ I κ B α complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Vol. 97. No. 3. p. 1014-1019.
41. KARIN M., BEN-NERIAH Y. 2000. Phosphorylation meets ubiquitination: The control of NF- κ B activity. *Annual Review of Immunology*. Vol. 18. p. 621-663.
42. KOPECKY S. A., WILLINGHAM M. C., LYLES D. S. 2001. Matrix protein and another viral component contribute to induction of apoptosis in cells infected with vesicular stomatitis virus. *Journal of Virology*. Vol. 75. No. 24. p. 12169-12181.
43. KOPECKY S. A. LYLES D. 2003. The cell-rounding activity of the vesicular stomatitis virus matrix protein is due to the induction of cell death. *Journal of Virology*. Vol. 77. No. 9. p. 5524-5528.
44. LAM V., DUCA K. A., YIN J. 2005. Arrested spread of vesicular stomatitis virus infections in vitro depends on interferon-mediated antiviral activity. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 90. No. 7. p. 794-804.
45. LEBLANC J-F., COHEN L., RODRIGUES M., HISCOTT J. 1990. Synergism between distinct enhancer domains in viral induction of the human beta interferon gene. *Molecular and Cellular Biology*. Vol. 10. No. 8. p. 3987-3993.
46. LEFÈVRE F., MARTINAT-BOTTÉ F., LOCATELLI A., DE NIU P., TERQUI M., LA BONNARDIÈRE C. 1998. Intrauterine infusion of high doses of pig trophoblast interferons has no antiluteolytic effect in cyclic gilts. *Biology of Reproduction*. Vol. 58. No. 4. p. 1026-1031.
47. LEGAULT M. 1995. Mutants du virus de la stomatite vésiculaire établissant une infection persistante: rôle de la fonction virale P, de la phosphorylation et de l'induction d'interféron. Mémoire. Université du Québec à Montréal.
48. LENARDO M. J., FAN C-M., MANIATIS T., BALTIMORE D. 1989. The involvement of NF- κ B in β -interferon gene regulation reveals its role as widely inducible mediator of signal transduction. *Cell*. Vol. 57. No. 2. p. 287-294.
49. LICATA J. M., HARTY R. N. 2003. Rhabdoviruses and apoptosis.

International Reviews of Immunology. Vol. 22. No. 5-6. p. 451-476.

50. LIN R., YANG L., NAKHAEI P., SUN Q., SHARIF-ASKARI E., JULKUNEN I., HISCOTT J. 2005. Negative regulation of the RIG-I induced antiviral state by the ubiquitin editing protein A20. *The Journal of Biological Chemistry*. Manuscript accepted. No. M510326200
51. LYLES D. 2000. Cytopathogenesis and inhibition of the host gene expression by RNA viruses. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Vol. 64. No. 4. p. 709-724.
52. MANIATIS T. 1999. A ubiquitin ligase complex essential for the NF- κ B, Wnt/Wingless, and Hedgehog signalling pathways. *Genes and Development*. Vol. 13. p. 505-510.
53. MELKI R., GAUDIN Y., BLONDEL D. 1994. Interaction between tubulin and the matrix protein of vesicular stomatitis virus: possible implications in the viral cytopathic effect. *Virology*. Vol. 202. No. 1. p. 339-347.
54. MERCURIO F., ZHU H., MURRAY B. W., SHEVCHENKO A., BENNETT B. L., LI J., YOUNG D. B., BARBOSA M., MANN M. 1997. IKK-1 and IKK-2: Cytokine-Activated I κ B kinases essential for the NF- κ B activation. *Science*. Vol. 278. No. 5339. p. 860-866.
55. NOURBAKHSH M., HAUSER H. 1999. Constitutive silencing of IFN- β promoter is mediated by NRF (NF- κ B-repressing factor), a nuclear inhibitor of NF- κ B. *The EMBO Journal*. Vol. 18. No. 22. p. 6415-6425.
56. OBUCHI M., FERNANDEZ M., BARBER G. N. 2003. Development of recombinant vesicular stomatitis viruses that exploit defects in host defense to augment specific oncolytic activity. *Journal of Virology*. Vol. 77. No. 16. p. 8843-8856.
57. REIS L.F.L., HARADA H., WOLCHOK J.D., TANIGUCHI T., VILCEK J. 1992. Critical role of a common transcription factor, IRF-1, in the regulation of IFN- β and IFN-inducible genes. *The European Molecular Biology Organization Journal*. Vol. 11. No. 1. p. 185-193.
58. RENARD P., PERCHERANCIER, KROLL M., THOMAS D., VIRELIZIER JL., ARENZANA-SEISDEDOS F., BACHELERIE F. 2000. Inducible NF- κ B activation is permitted by simultaneous degradation of nuclear I κ B α . *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 275. No. 20. p. 15193-15199.

59. RICOTE M., GARCIA-TUNON I., BETHENCOURT F., FRAILE B., ONSURBE P., PANIAGUA R., ROYUELA M. 2006. The p38 transduction pathway in prostatic neoplasia. *Journal of pathology*. Vol. 208. No. 3. p.401-407.
60. RIEDER M., CONZELMANN K-K. 2009. Rhabdovirus evasion of the interferon system. *Journal of Interferon and Cytokine Research*. Vol.29. No.9. p.499-509.
61. ROBERTS A., REUTER J. D., WILSON J. H., BALDWIN S., ROSE J. K. 2004. Complete protection from Papillomavirus challenge after a single vaccination with a vesicular stomatitis virus vector expressing high levels of L1 protein. *Journal of Virology*. Vol. 78. No.6. p. 3196-3199.
62. ROSE J.K., WHITT M.A. 2001. Chapitre 38: Rhabdoviridae : The viruses and their replication. *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins. 4^e edition. Vol.1 en cd. p.3280.
63. ROSE N. F., MARX P. A, LUCKAY A., NIXON D. F., MORETTO W. J., DONAHOE S. M., MONTEFIORI D., ROBERTS A., BUONOCORE L., ROSE J. K. 2001. An effective AIDS vaccine based on live attenuated vesicular stomatitis virus recombinants. *Cell*. Vol. 106. No.5. p. 539-549.
64. SACHDEV S., HOFFMAN A., HANNINK M. 1998. Nuclear localization of I κ B α is mediated by the second ankyrin repeat: the I κ B α ankyrin repeats define a novel class of *cis*-acting nuclear import sequences. *Molecular and Cellular Biology*. Vol. 18. No. 5. p. 2524-2534.
65. SAMUEL C. 2001. Antiviral actions of interferons. *Clinical Microbiology Reviews*. Vol. 14. No. 4. p. 778-809.
66. SHAW M., CARDENAS W.B., ZAMARIN D., PALESE P., BASLER C.F. 2005. Nuclear localization of the Nipah virus W protein allows for inhibition of both virus and toll-like receptor 3 triggered signalling pathways. *Journal of Virology*. Vol. 79. No. 10. p. 6078-6088.
67. SPENCER E., JIANG J., CHEN Z. J. 1999. Signal-induced ubiquitination of I κ B α by the F-box protein Slimb/ β -TrCP. *Genes and Development*. Vol. 13. No.3. p. 284-294.
68. STOJDL D. F., ABRAHAM N., KNOWLES S., MARIUS R., BRASEY A., LICHTY B. D., BROWN E. G. SONENBERG N., BELL J.C. 2000. The murine double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR is required for the

- resistance to vesicular stomatitis virus. *Journal of Virology*. Vol. 74. No. 20. p. 9580-9585.
69. STOJDL D. F., LICHTY B. D., TENOEVER B. R., PATERSON J.M., POWER A. T., KNOWLES S., MARIUS R., REYNARD J., POLIQUIN L., ATKINS H., BROWN E. G., DURBIN R. K., DURBIN J. E., HISCOTT J., BELL J.C. 2003. VSV strains with defects in their ability to shutdown innate immunity are potent systemic anti-cancer agents. *Cancer Cell*. Vol. 4. No. 4. p. 263-275.
 70. TAM W., SEN R. 2001. I κ B family members function by different mechanisms. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 276. No. 11. p. 7701-7704.
 71. THANOS D., MANIATIS T. 1995. NF- κ B: A lesson in family values. *Cell*. Vol. 80. No.4. p. 529-532.
 72. THANOS D. 1996. Mechanisms of transcriptional synergism of eukaryotic genes. *Hypertension (American Heart Association)* Vol. 27. No.4. p. 1025-1029.
 73. TICHOPAD A., DIDIER A., PFAFFL M. W. 2004. Inhibition of real-time RT-PCR quantification due to tissue-specific contaminants. *Molecular and Cellular Probes*. Vol. 18. No.1. p.45-50.
 74. TROTTIER, JR. M. D., PALIAN B. M., REISS C. S. 2005. VSV replication in neurons is inhibited by type I IFN at multiple stages of infection. *Virology*. Vol. 333. No.2. p. 215-225.
 75. TURPIN P., HAY R. T., GARGEMONT C. 1999. Characterization of I κ B α nuclear import pathway. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 274. No. 10. p. 6804-6812.
 76. WILKENING S. et BADER A. 2004. Quantitative real-time polymerase chain reaction: Methodical analysis and mathematical model. *Journal of Biomolecular Techniques*. Vol. 15. No. 2. p. 107-111.
 77. XAGORARI A. et CHLICHLIA K. 2008. Toll-Like Receptors and Viruses: Induction of innate Antiviral immune responses. *The Open Microbiology Journal*. Vol.2.p.49-59.
 78. YARON A., GONEN H., ALKALAY I., HATZUBAL A., JUNG S., BEYTH S., MERCURIO F., MANNING A. M., CLECHANOVER A., BEN-NERIAH Y. 1997. Inhibition of the NF- κ B cellular function via specific targeting of the I κ B-ubiquitin ligase. *The European Molecular Biology Organization Journal*. Vol. 16. No. 21. p. 6486-6494.

79. YUAN H., YOZA B.K., LYLES D.S. 1998. Inhibition of host RNA polymerase II-dependent transcription by vesicular stomatitis virus results from inactivation of TFIID. *Virology*. Vol. 251. No. 2. p. 383-392.
80. YUAN H., PUCKETT S., LYLES D.S. 2001. Inhibition of host transcription by vesicular stomatitis virus involves a novel mechanism that is independent of phosphorylation of TATA-binding protein (TBP) or association of TBP with TBP-associated factor subunits. *Journal of Virology*. Vol. 75. No. 9. p. 4453-4458.